

Untersuchung des Einheilungsverhaltens von mit Bone
Morphogenetic Protein-2 beschichteten
Titanimplantaten an Kaninchen und alten
osteoporotischen Mutterschafen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Matthias Keller

geboren am 24.09.1977 in Pasewalk

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Raimund Kinne, Jena**
- 2. Prof. Dr. Wolfram Neumann, Magdeburg**
- 3. Prof. Dr. Rudolf-Albert Venbrocks, Eisenberg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.2005

1. Abkürzungen

a. d.	destilliertes Wasser (aqua dest)
AS	Aminosäuren
DNA	Desoxyribonucleinsäure
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin- Eosin
rhBMP	rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
TEP	Totalendoprothese

1.1 Verwendete Einheiten

A	Ampère
As	Ampèresekunde
D	Dalton
G	Gramm
H	Stunde
L	Liter
M	mol/Liter
mol	Stoffmenge
min	Minute
N	Newton
S	Sekunde
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt

1.2 Präfixe

K	Kilo
M	Milli
μ	Mikro
N	Nano

2. Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	I
1.1 Verwendete Einheiten	I
1.2 Präfixe	I
2. Inhaltsverzeichnis	II
3. Zusammenfassung.....	5
4. Einleitung.....	7
4.1 Allgemeine Problematik und Voruntersuchungen.....	7
4.2 Allgemeiner Aufbau des Knochens.....	7
4.3 Gestörte Knochenphysiologie.....	9
4.4 Prinzip der Implantateinheilung.....	10
4.5 BMPs (Bone Morphogenetic Proteins).....	14
4.5.1 BMP-2.....	15
4.5.2 Vorarbeiten	16
4.6 Spezielle Problematik-Experimentelle Zielsetzung.....	19
5. Materialien.....	21
5.1 Geräte	21
5.2 Chemikalien	21
5.3 Färbungen	22
5.4 Verbrauchsmaterialien	22
5.5 Computersoftware.....	22
6. Methoden	23
6.1 Versuchsablauf.....	23
6.1.1 Kaninchen	23
6.1.2 Schafe.....	23
6.2 Herstellung der Implantate.....	24
6.2.1 Kaninchenimplantate	24
6.2.2 Schafimplantate.....	25
6.3 Operationstechnik mit Einbringen der Implantate.....	26

6.3.1	Kaninchen	26
6.3.2	Schaf	28
6.4	Entnahme der Implantate und ihre Weiterverarbeitung	30
6.5	Auswertungsverfahren	31
6.5.1	Röntgen	31
6.5.1.1	Kaninchen	31
6.5.1.2	Schaf	31
6.5.2	Histologie	32
6.5.2.1	Dünnschliffe	32
6.5.2.2	Konservativ hergestellte Gewebsschnitte	33
6.5.2.3	Färbung der Gewebspräparate	33
6.5.2.4	Mikroskopische Untersuchung	34
6.5.3	Ausrissversuche	34
7.	Ergebnisse	37
7.1	Kaninchenversuche	37
7.1.1	Radiologie	37
7.1.2	Histologie	39
7.2	Schafversuche	52
7.2.1	Makroskopische Ergebnisse	52
7.2.2	Radiologie	53
7.2.3	Histologie	57
7.2.3.1	Konventionelle Histologie	57
7.2.3.2	Dünnschliffe	71
7.2.4	Ausrissversuche	77
8.	Diskussion	81
8.1	Ergebnisse der Tiermodelle	81
8.1.1	Kaninchenmodell	81
8.1.2	Schafmodell	81
8.2	Eignung und Probleme der Tiermodelle	84
8.3	Histologische Auswertungsverfahren	85
8.4	Ausrissversuche	85
8.5	Anzahl der verwendeten Tiere	86

8.6	Verwendete BMP-2-Dosis	86
9.	Schlussfolgerung	87
10.	Literaturverzeichnis	88
11.	Anhang	95
11.1	Ehrenwörtliche Erklärung	95
11.2	Lebenslauf	96
11.3	Danksagung	97

3. Zusammenfassung

Gelenkverschleiß oder Gelenkzerstörung sind ein zunehmendes Problem der immer älter werdenden Patienten. In steigendem Maße werden deshalb Totalendoprothesen eingesetzt. Das Hauptproblem ist dabei nicht das technische Funktionieren des Kunstgelenkes an sich, sondern der im höheren Lebensalter der betroffenen Menschen bestehende Knochenstrukturverlust bzw. die systemische und lokale Osteoporose und damit verbunden der Verlust an knochenkompetenten Zellen. Im Ergebnis führt dies zu einer schlechten oder verzögerten Implantateinheilung.

Es ist anzunehmen, dass durch die Verwendung bestimmter Wachstumsfaktoren in Kombination mit geeigneten herkömmlichen Implantatbeschichtungen diesem Knochenverlust entgegengewirkt und die Einheilung beschleunigt werden könnte.

Bisherige tierexperimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, u. a. BMP-2, in der Lage sind, das Einheilen von Implantaten zu verbessern.

Im Klein-(Kaninchen) und Großtier-(Schaf)-Experiment sollte die Wirkung von rekombinantem humanen BMP-2 als Beschichtung von eigens hergestellten Implantaten untersucht werden. Die verwendeten Schafe waren zwischen 8 und 12 Jahren alt, was bezüglich der osteoporotischen Knochensituation erschwerten Einheilbedingungen entsprach.

Ausgewertet wurden die zu bestimmten Zeitpunkten entnommenen Proben durch konventionelle Radiologie, Histologie und Ausrissversuche (nur beim Schaf). An den Schafen wurden auch während der Versuchszeit radiologische Verlaufskontrollen zu festgelegten Zeitpunkten durchgeführt.

Eine Toxizität des BMP-2 oder andere Nebenwirkungen konnten in keiner Weise nachgewiesen werden. Die Implantateinheilung fand unter BMP-2-Einfluß beschleunigt statt. Sowohl beim Kaninchen als auch beim Schaf bewirkte das BMP-2 eine Neubildung von Knochenmark und Geflechtknochen. Im weiteren Verlauf war eine Reorientierung des neuen Knochens zum Implantat mit abschließender Kompaktierung zu beobachten. Im Ausrissversuch erzielten die BMP-2-beschichteten Zylinder nach 20 Wochen signifikant höhere Werte als die Kontrollen.

BMP-2 führte also in den alten Schafen zur Aktivierung biologischer Prozesse mit Freisetzung zusätzlicher Heilungsreserven aus dem Markraum und der Bildung eines adaptiv wachsenden Knochens.

Die genannten Ergebnisse stellen neue Erkenntnisse über die Wirkung von BMP-2 besonders am alten osteoporotischen Knochen dar. Demnach könnte es sinnvoll sein bei Menschen, die sich durch hohes Alter auszeichnen oder aus anderen Gründen kritische Parameter für die Knochenheilung aufweisen, BMP-2 als zusätzliche Implantatbeschichtung zu verwenden.

4. Einleitung

4.1 Allgemeine Problematik und Voruntersuchungen

Totalendoprothesen (TEP) sind bei fortgeschrittenem Gelenkverschleiß oder zunehmender Gelenkzerstörung oft die einzige Therapieoption, um Schmerzfreiheit bei gleichzeitigem Erhalt der Beweglichkeit zu erreichen. Z. B. ist der totale Gelenkersatz der Hüfte mittlerweile die Standardmethode zur Behandlung verschiedener Hüftleiden (Murakami et al., 2003). Ursache für diese chronischen meist im Alter auftretenden Gelenkveränderungen sind vor allem die Arthrosis deformans und einige Arthritiden, besonders aus dem rheumatischen Formenkreis. Weitere TEP-Indikationen sind bestimmte Frakturen, wie die dislozierte Schenkelhalsfraktur beim alten Menschen.

Die Implantologie hat in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erhalten. In Deutschland werden pro Jahr über 120000 metallische Großimplantate im orthopädischen Bereich eingesetzt (Jennissen, 2000). Demzufolge ist das Interesse an der Entwicklung neuer zementfreier Implantatfixationstechniken sehr groß (Esenwein et al., 2001). Nach Malchau et al. (1993) kommt es bei etwa sieben Prozent der Patienten mit Großimplantaten nach zehn Jahren zum Implantatversagen. Ursache dafür ist eine mechanische Lockerung der Prothese durch eine periprotetische Osteolyse (Dunbar et al., 2001).

Die Stabilisierung zementfreier Totalendoprothesen ist abhängig von einer mechanischen Verbindung zwischen Implantat und Knochen, weshalb den Regenerationsmöglichkeiten des Knochens eine immense Bedeutung zukommt (Sumner and Galante, 1990). Durch geeignete Oberflächenbeschichtungen ist bereits versucht worden, das Einwachsen von Knochengewebe in die poröse Struktur zu ermöglichen (Lord and Bancel, 1983). Indem die Knochentrabekel in diese Oberfläche einwachsen, werden Relativbewegungen zwischen Implantat und Knochen minimiert und somit eine stabile Verankerung erreicht (Stallforth and Blömer, 1994). Alte Patienten mit osteoporotischen Erkrankungen bilden jedoch eine wichtige Ausnahme. Trotz moderner Beschichtungen erfolgt bei ihnen das Einheilen solcher Implantate stark verzögert. Auf Grund des verzögerten Einheilungsprozesses besteht das hohe Risiko einer nachträglichen Lockerung.

4.2 Allgemeiner Aufbau des Knochens

Zusammen mit dem Zahnbein ist ausdifferenzierter Knochen nach dem Zahnschmelz die härteste Substanz des Körpers. Wichtige Eigenschaften dieses Knochens sind eine hohe

Druck- und Zugfestigkeit sowie eine gute Anpassungsfähigkeit an veränderte statische Bedingungen.

Der ausdifferenzierte Lamellenknochen entsteht allerdings erst sekundär. Der primär gebildete Knochen wird Geflechtknochen genannt. Dieser entsteht aus mesenchymalem Gewebe entweder über die desmale oder die chondrale Ossifikation.

Bei der desmalen, direkten Ossifikation wird der Knochen unmittelbar aus dem Mesenchym gebildet. Mesenchymzellen differenzieren sich zu Osteoblasten und die Ossifikation schreitet von sogenannten Ossifikationspunkten zentrifugal fort.

Bei der chondralen, indirekten Ossifikation entsteht als erstes Knorpel, der dann wiederum von Ossifikationspunkten ausgehend in Geflechtknochen umgewandelt wird.

Aus dem Geflechtknochen wird innerhalb der ersten Lebensjahre der stabilere Lamellenknochen gebildet. Dies geschieht folgendermaßen: Osteoklasten (knochenabbauende mehrkernige Zellen) bohren in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen zahlreiche Kanäle. Die entstandenen Hohlzylinder werden dann durch Osteoblasten (knochenaufbauende einkernige Zellen) mit konzentrischen Lamellen ausgefüllt. Am Ende bleibt nur das zentrale Gefäß bestehen. Mit zunehmender Bildung der Lamellensysteme wird der Geflechtknochen allmählich abgebaut.

Beim Sägeschnitt durch einen Knochen erkennt man die äußere Kompakta oder Kortikalis und die innere Spongiosa. Die Kompakta ist außen mit Knochenhaut - dem Periost - überzogen. In der inneren zellreichen Schicht des Periost, die Nerven und Blutgefäße enthält, werden beim wachsenden und regenerierenden Knochen Osteoblasten gebildet. Die äußere Schicht setzt sich aus straff angeordneten Kollagenfaserbündeln zusammen, die radiär in den Knochen einstrahlen. Die innere zum Markraum gerichtete Oberfläche der Spongiosa ist mit sogenanntem Endost bedeckt. Aus dem Endost, welches einschichtig ist und keine Kollagenfasern enthält, können ebenfalls Osteoblasten aus Vorläuferzellen entstehen.

Im histologischen Querschnitt der Kompakta sind die Lamellensysteme, auch Osteone oder Haverssche Systeme genannt, gut zu erkennen. Ein einzelnes Osteon, das im Zentrum ein 20 – 300µm kleines Kanälchen mit Blutgefäßen (Haverssche Gefäße) besitzt, besteht aus etwa 4 – 20 konzentrischen Lamellen. Schaltlamellen, die Reste älterer Osteone, füllen die Lücken zwischen den Osteonen aus. Einige jüngere Osteone erkennt man an der sogenannten Kittlinie, mit der sie gegen die ältere Umgebung abgegrenzt sind. Innerhalb der Lamellen sind die Osteozyten sichtbar, welche die höher differenzierte und inaktivere Form der Osteoblasten darstellen. Die Osteozyten stehen durch Fortsätze miteinander in

Verbindung. Über diese Fortsätze laufen gewisse nervale Steuerungsprozesse ab. Das heißt der einzelne Osteozyt ist Teil eines Netzwerks, in dem Informationen, z. B. zur mechanischen Beanspruchung des Knochens, weitergegeben werden. (Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen; Leonhardt, H.)

In den mikroskopischen Bildern in Abb. 1 sind normale Knochenverhältnisse am Menschen dargestellt. In Abb. 1a erkennt man hintereinander aufgereihte Osteoblasten (siehe Pfeil 1). Im zweiten Bild ist ein größerer Ausschnitt von Knochenmark zu sehen. Zum einen ist Fettmark im Sinne einer physiologischen Alterung (siehe Pfeil 2), zum anderen sind aber auch viele vitale Knochenmarkszellen zu finden (siehe Pfeil 3).

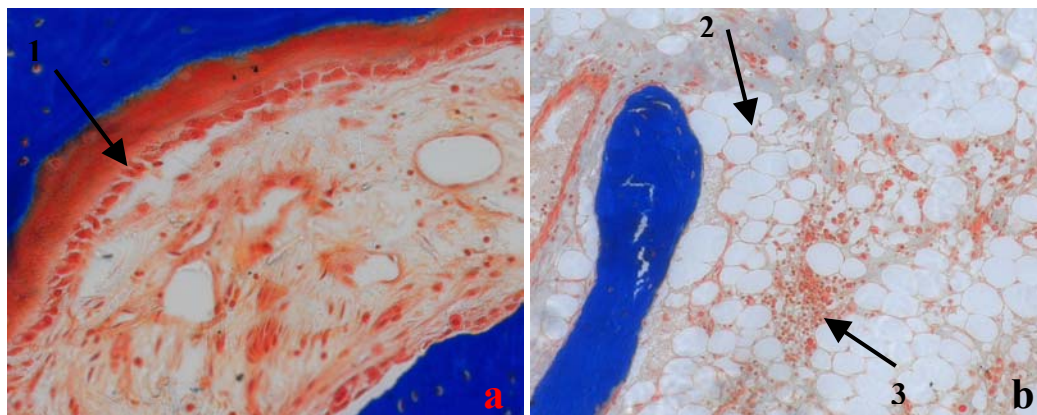


Abb. 1a und b: a) zeigt Osteoblasten in 8x20; b) zeigt vitales Knochenmark in 8x10; Färbung nach Masson-Goldner

Chemisch gesehen besteht ausdifferenzierter Knochen aus 62% anorganischen Substanzen, 25% organischen Substanzen und 13% Wasser. Calciumphosphat nimmt mit 85% den größten Anteil unter den anorganischen Salzen ein. Die organischen Bestandteile bestehen vorwiegend aus Kollagen. (Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen; Leonhardt, H.)

4.3 Gestörte Knochenphysiologie

Im Alter kommt es zunehmend zum physiologisch normalen Abbau von Knochenmasse insbesondere der Spongiosastruktur. Kommt es aber zu einem verstärkten generalisierten Abbau von Knochenmasse spricht man von Osteoporose. Sie ist durch eine gestörte Mikroarchitektur sowie eine verminderte Knochenfestigkeit gekennzeichnet und prädisponiert zu erhöhtem Frakturrisiko. Die Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter.

Ätiologisch unterscheidet man primäre und sekundäre Osteoporosen. Zu den viel häufigeren primären Osteoporosen (95%) gehören die juvenile, die postmenopausale (Typ I-Osteoporose) und die senile (Typ II-Osteoporose) Osteoporose. Die sekundären Formen sind unter anderem endokrin, renal, intestinal oder medikamentös (Langzeittherapie mit Kortikosteroiden) bedingt.

Risikofaktoren der primären Osteoporose sind hohes Alter, weibliches Geschlecht, positive Familienanamnese, Mangel an Geschlechtshormonen (frühe Menopause, Ovariectomie), körperliche Inaktivität und Ernährungsfaktoren (hoher Tabak-, Alkohol- und Kaffeegenuss; kalziumarme Ernährung, hohes Über- oder Untergewicht).

Klinische Symptome der Osteoporose sind akute (besonders nach Frakturen) und chronische Schmerzen (besonders im Rücken), Spontanfrakturen und Wirbelsäulenveränderungen (Rundrücken, Körpergrößenabnahme). (Innere Medizin; Herold, G.)

In Abb. 2 sieht man pathologische Knochenstrukturen im Sinne eines osteoporotischen Substanzverlustes. Sowohl die Spongiosa als auch das Mark erscheinen rarefiziert. Im Knochenmark findet man Fett und faseriges Gewebe, aber keine Osteoblasten oder andere vitale Zellen.

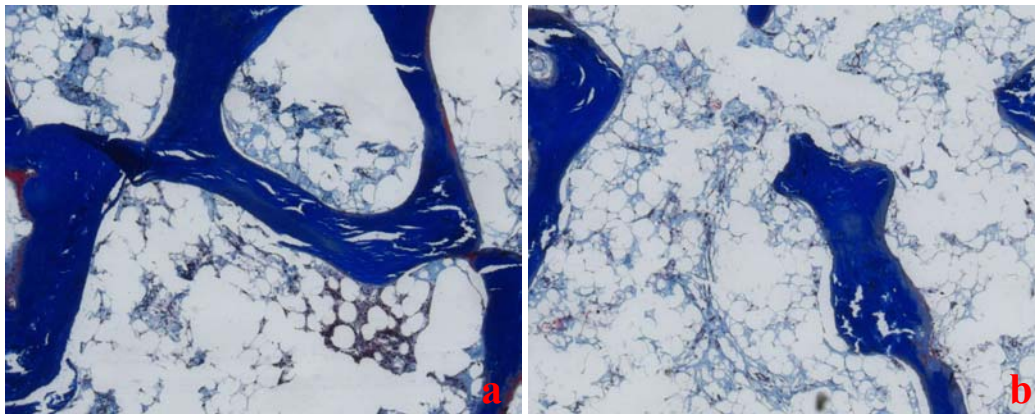


Abb. 2a und b: Osteoporotischer Knochen in 8x5; Färbung nach Masson-Goldner

Es ist leicht vorstellbar, dass unter diesen Bedingungen die Implantateinheilung im Knochen erschwert ist.

4.4 Prinzip der Implantateinheilung

Grundsätzlich gibt es zwei Methoden um ein Gelenkimplantat im Knochen zu verankern: mit oder ohne Knochenzement. Durch Zement wird eine hohe Primärstabilität erreicht. Der Nachteil des Zements liegt nicht so sehr in der Toxizität und der schwierigen Entfernbarkeit bei einem Prothesenwechsel, sondern in der hohen Temperaturentwicklung (60°C) beim

Erstarrungsvorgang. Dadurch kommt es zur Eiweißzerstörung im umliegenden Knochengewebe. Es handelt sich hier also um ein starres System, welches auf veränderte Beanspruchung vorerst nicht mehr reagieren kann und somit leicht zur Lockerung der Prothese führen kann. Implantate, die ohne Zement im Knochen verankert werden, besitzen Oberflächenbeschichtungen, um ein aktives Einheilen des Implantats seitens des Knochens zu erreichen (Lord and Bancel, 1983). Durch die Implantation im sogenannten „Pressfit“-Verfahren ist die erreichte postoperative Primärstabilität dieser Implantate ebenfalls sehr hoch. Allerdings kommt es sekundär zu einer gewissen Instabilität durch den von der Prothese auf den Knochen ausgeübten Druck. Dieser Prozess schreitet bis sechs Wochen postoperativ fort. Danach wird durch Einwachsvorgänge seitens des Knochens wieder eine Zunahme der Stabilität erreicht. Zwölf Wochen nach der Implantation ist die Einheilung der Prothese abgeschlossen. Bei alten Menschen mit osteoporotischen Verhältnissen kann sich die Einheilung jedoch verzögern. Das bedeutet, dass nach zwölf Wochen das Implantat nicht oder nur teilweise eingewachsen ist. Dadurch bedingt ist die Gefahr einer Prothesenlockerung sehr groß. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Oberflächenbeschichtungen, wie z. B. Porocoat® oder Hydroxylapatit. Durch ihre poröse Struktur sollen sie dem Knochen eine geeignete Verankerungsmöglichkeit und Leitschiene bieten. Den hier wirkenden Mechanismus bezeichnet man als Osteokonduktivität (Groeneveld and Burger, 2000; Li and Wozney, 2001). Das bedeutet, vorhandener Knochen kann zu weiterem Wachstum stimuliert werden. Dazu müssen Knochen und Implantatoberfläche in direktem Kontakt miteinander stehen.

Die Porocoat®-Beschichtung entsteht aus einem Metallpulver, welches aus dem gleichen Metall wie die Prothese besteht (z. B. Titanpulver bei Titanprothese) und im Sinterverfahren bei ca. 1200°C auf die Prothese aufgetragen wird. Weiterhin ist im Pulver noch ein zweites Metall mit niedrigerer Schmelztemperatur als das eigentliche Beschichtungsmetall enthalten. Dieses zweite Metall fungiert als Platzhalter. Während des Sinterungsprozesses schmilzt es und hinterlässt dabei kleine Poren. Die Sinterungstemperatur bleibt jedoch unter der Schmelztemperatur des eigentlichen Beschichtungsmetalls. Dessen Teilchen werden nur weicher, so dass ihre Kontaktflächen untereinander und mit der Implantatoberfläche verschmelzen. Durch diesen Vorgang entsteht eine sehr feste dreidimensionale Oberflächenstruktur (siehe Abb. 3). (DePuy)

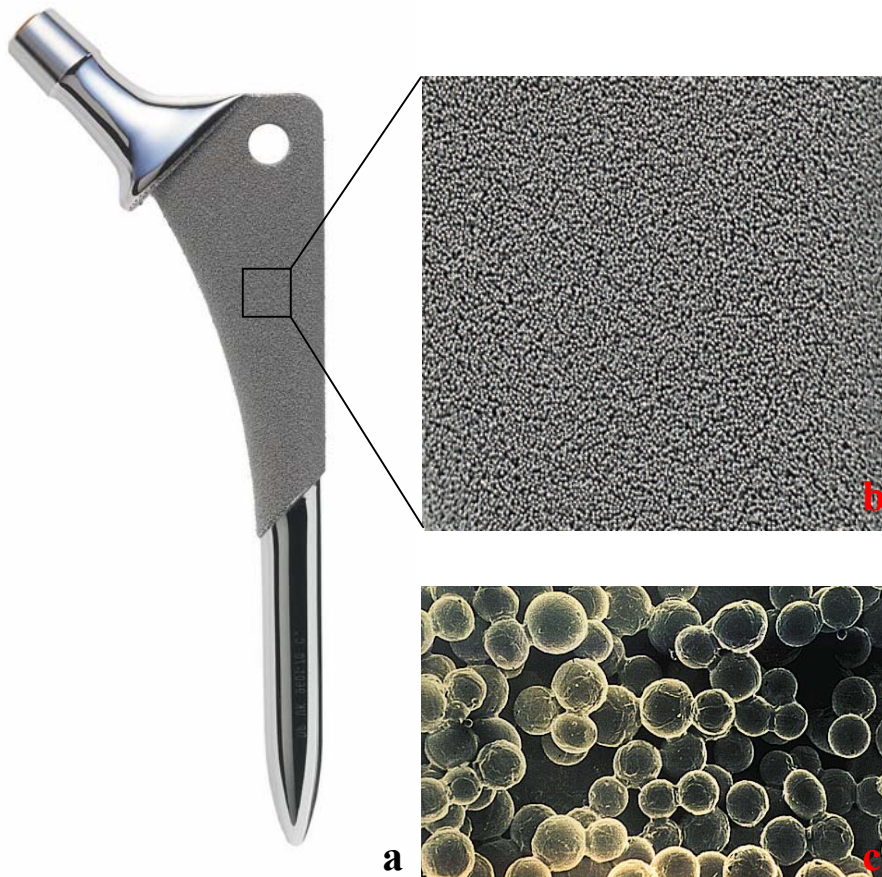


Abb. 3a-c: a) Hüftprothese mit Porocoat®-Beschichtung; b) vergrößerte Darstellung der Porocoat®-Beschichtung aus a; elektronenmikroskopische Aufnahme des Porocoat®; alle Bilder mit freundlicher Genehmigung der Firma DePuy

Die Hydroxylapatit-Beschichtung wird hergestellt, indem das Hydroxylapatitpulver ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$) im Plasmasprayverfahren bei ca. 18000°C (Temperatur der Plasmaflamme) aufgetragen wird, wobei eine zweidimensionale poröse Oberfläche geschaffen wird (siehe Abb. 4). Hydroxylapatit ist bezüglich der Wachstumsstimulation von Knochen das am besten untersuchte Beschichtungsverfahren (Søballe et al., 1993). Es wird vermutet, dass diese Stimulation dadurch entsteht, dass Wachstumsfaktoren aus dem Spongiosa- und Markraum durch die Oberflächenmaterialien gebunden werden und dort ein Knochenwachstum herbeiführen (Søballe et al., 1993). Voraussetzung ist hierbei also vitales Knochengewebe.

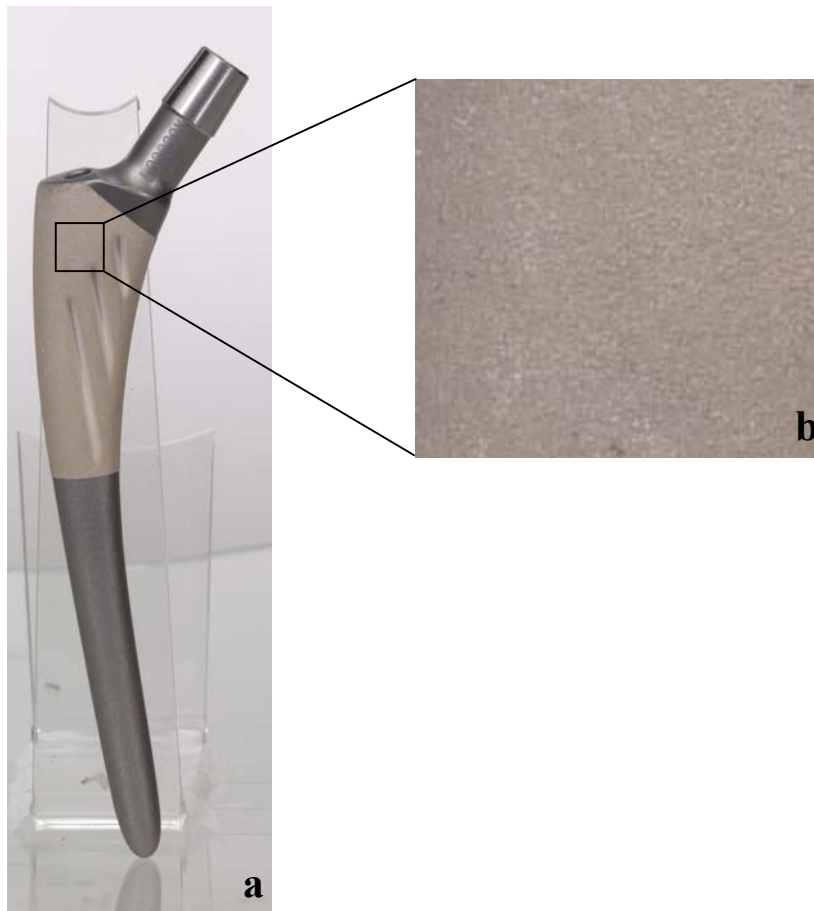


Abb. 4a: a) Hüftprothese mit Hydroxylapatit-Beschichtung; b) vergrößerte Darstellung der Hydroxylapatit-Beschichtung; alle Bilder mit freundlicher Genehmigung der Firma DePuy

Neben der Osteokonduktivität unterscheidet man noch die Osteoinduktivität. Darunter verstand man ursprünglich, dass neuer Knochen an ektooper Stelle gebildet, also induziert wird (Urist, 1965; Urist et al., 1967). Im weiteren Sinne bezeichnet Osteoinduktivität die Knochenneubildung, ohne dass Osteoblasten vorhanden sein müssen (Li and Wozney, 2001). Demnach kann also auch in aosteoblastärem Knochen oder Mark Knochenbildung induziert werden. Osteoinduktive Stoffe bewirken die Stimulation von undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen in Chondro- und Osteoblasten (Urist, 1965; Reddi, 1981; 1994). Weiterhin haben diese Stoffe chemotaktisches Potenzial, um Vorläuferzellen oder auch differenzierte Zellen anzulocken (Lind et al., 1996). Für die Neubildung von Knochen aus mesenchymalen Vorläuferzellen werden aber spezielle Knochenwachstumsfaktoren benötigt, u. a. die sogenannten BMPs.

4.5 BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

BMPs gehören zur TGF β (transforming growth factor β)-Superfamilie (Kingsley, 1994; Ducky and Karsenty, 2000; Riley et al., 1996), einer Gruppe von Peptidwachstumsfaktoren, unter denen 30 BMPs (Ducky and Karsenty, 2000) identifiziert wurden.

BMPs werden aus einem großen Vorgängermolekül synthetisiert, anschließend dimerisiert und durch proteolytische Spaltung des Propeptids in die reife und aktive Form überführt (Kingsley, 1994; Wozney et al., 1988; 1989). Die BMP-Monomere sind innerhalb des Dimers über sieben Disulfidbindungen miteinander verbunden (Wozney et al., 1988; 1989). Sie sind als Homodimere sowie auch als Heterodimere aktiv (Kingsley, 1994; Wozney et al., 1988), wobei letztere aktiver sein können (Israel et al., 1996).

Die Wirkung von BMPs wird über einen transmembranalen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor übermittelt (Abb. 5a) (Kingsley, 1994). Dieser besteht aus einem Heterodimerkomplex, der sich aus Rezeptor Typ I (BMPR I A+B) und Rezeptor Typ II (BMPR II) zusammensetzt (Kingsley, 1994; Groeneveld and Burger, 2000). Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über Smad-Proteine, welche regulierende Funktionen haben (Abb. 5a) (Nakayama et al., 2000; Graff et al 1996).

Der Name der BMPs, auch OPs (Osteogenetic Proteins) genannt, ist bedingt durch ihren Entdeckungsort in demineralisierter Knochenmatrix. Urist (1965) injizierte bei Nagern Knochenmatrix subkutan bzw. intramuskulär und beobachtete eine ektope Knochenbildung.

Jedoch gelang es erst viele Jahre später, die für die Knorpel- und Knochenbildung verantwortlichen BMPs aus einer Vielzahl von Spezies zu isolieren (Wang et al., 1988; Sampath et al., 1983; 1987). In diese Zeit fiel auch die Isolierung der Gene einiger BMPs, u. a. BMP-2 (Wozney et al., 1988; Celeste, 1990), welche die rekombinante Herstellung von BMPs ermöglichte (Wang et al., 1990; Sampath et al., 1992).

Das bekannteste Merkmal der BMPs ist die Knorpel- und Knocheninduktion (Urist, 1965; Kingsley, 1994; Wang et al., 1990; Li and Wozney, 2001; Sampath et al., 1992). Dabei bewirken die BMPs eine Reihe von Vorgängen auf zellulärer Ebene, wie die Chemotaxis und Proliferation von Vorläuferzellen und die Differenzierung dieser Zellen mit anschließender Knorpel- und Knochenbildung (Urist, 1965; Reddi, 1981; 1994). Außer ihrer chondrogenen und osteogenetischen Wirkung haben BMPs unter anderem Einfluss auf die Embryogenese (Wozney, 1992; Riley et al., 1996), z. B. des Skeletts (Kingsley et

al., 1992; Lyons et al., 1995), des Nervensystems (Schildauer et al., 1994) und des Herzens (Lyons et al., 1990). Ebenso von Bedeutung sind die BMPs bei der Regeneration mesenchymaler Gewebe im adulten Organismus (Wozney et al., 1992), z. B. bei der Frakturheilung (Bostrom et al., 1995).

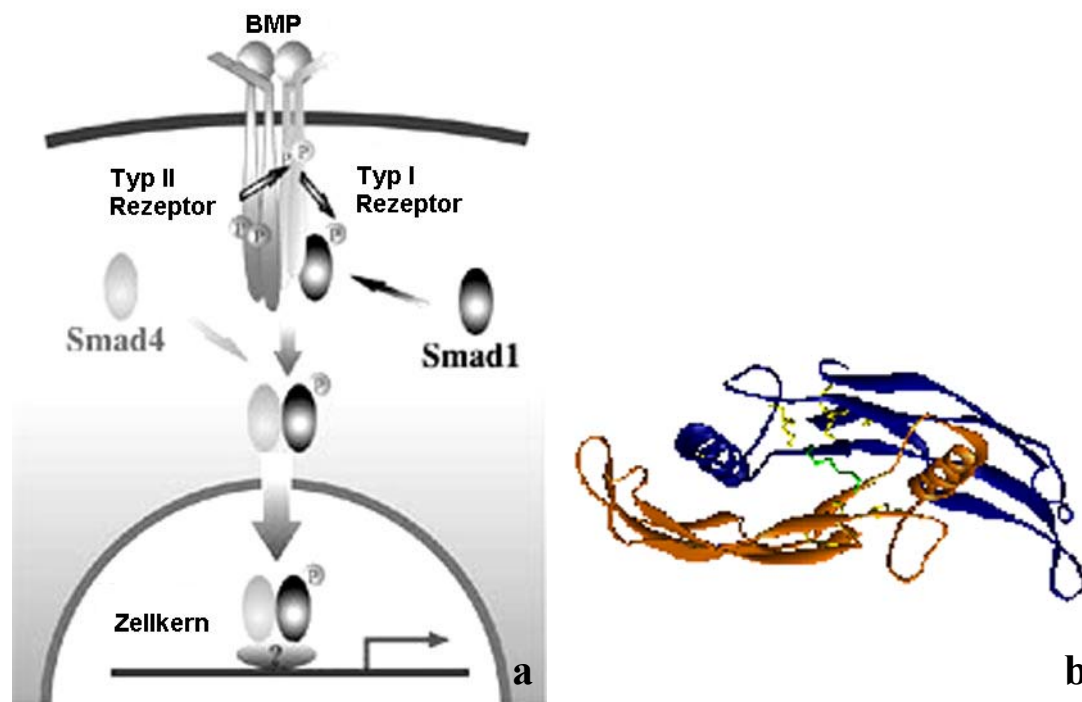


Abb. 5a und b: a) Signaltransduktion der BMPs (mit Änderung entnommen: www.ahsu.edu); b) BMP-2-Strukturmolekül (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. P. Hortschansky)

4.5.1 BMP-2

Bezüglich der Osteogenese ist das BMP-2 von besonderem Interesse. Es kann seit einigen Jahren rekombinant hergestellt werden (Wang et al., 1990). RhBMP-2 liegt als Homodimer (32 KD) (Abb. 5b) vor, wobei sich jedes Monomer aus 114 AS (aktive Form) zusammensetzt (Riley et al., 1996). In der Literatur ist beschrieben, dass BMP-2 in der nativen Form auch als Heterodimer vorkommt (Kingsley, 1994; Riley et al., 1996). Einige Heterodimere können eine stärkere Wirkung entfalten als die jeweiligen Homodimere (Israel et al., 1996).

BMP-2 ist dafür bekannt Knochengewebe zu induzieren (Vehof et al., 2001; Wang et al., 1990). Neben seiner Funktion während der Embryogenese (Schildauer et al., 1994) spielt BMP-2 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten (Riley et al., 1996; Thies et al., 1992; Yamaguchi et al., 1991) und damit auch bei der Heilung von

Knochenbrüchen (Bostrom et al., 1995). Es hat einen chemotaktischen Einfluss auf differenzierte und undifferenzierte Osteoblasten (Lind et al., 1996).

4.5.2 Vorarbeiten

Bei dem in diesem Versuch verwendeten BMP-2 handelte es sich um ein neues Verfahren zur Herstellung von rekombinantem humanen BMP-2 in *E. coli* (Patent DE 199 44 626 A1). Die DNA-Sequenzen des reifen BMP-2 und der extrazellulären Domäne des humanen BMP-2-Rezeptors (ALK-3 ECD) wurden an den C-Terminus des hochlöslichen *E. coli* Maltosebindungsproteins (MBP) fusioniert (Hortschansky et al., 2002). Der Linker zwischen MBP und den Fusionspartnern war mit Sequenzen zur Freisetzung des Zielprodukts durch Proteasen gekennzeichnet (Hortschansky et al., 2002). Dann erfolgte die Induktion zur zytoplasmatischen Produktion von Maltosebindungsprotein (MBP)-BMP-2-Monomeren. Die löslichen monomeren MBP-BMP-2-Fusionsproteine wurden nach Zellaufschluss mit Hilfe von Amylosechromatographiesäulen isoliert. Die Fusionsproteine konnten jetzt einfach dimerisiert und biologisch aktives BMP-2 mittels einer Endoprotease isoliert werden. (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

Die Funktionalität des hergestellten BMP-2 wurde durch die Myoblasten-Zelllinie C2C12 überprüft. Dabei wurde die durch das BMP-2 bedingte konzentrationsabhängige Induktion der alkalischen Phosphatase als Markerprotein der osteogenen Differenzierung gemessen (Abb. 6). (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

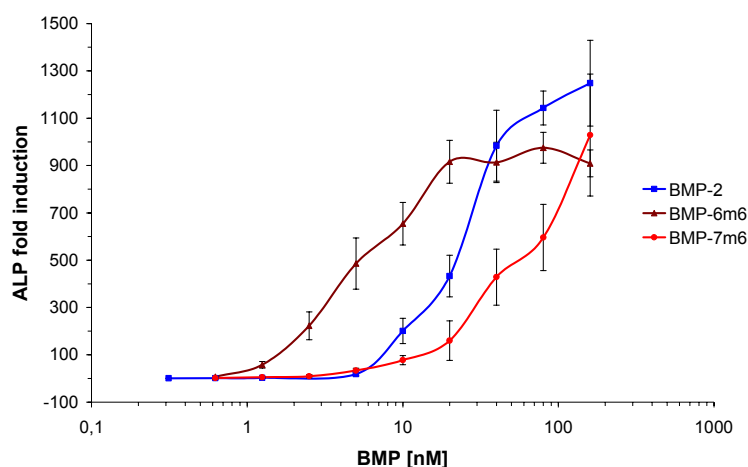


Abb. 6: Induktion der Expression der Alkalischen Phosphatase in C2C12 Zellen nach Stimulation mit verschiedenen rekombinant hergestellten BMPs (Knochenersatzmaterialien zur Therapie der Osteoporose, DePuy-BioTech Jena)

Des weiteren wurde die biologische Aktivität des BMP-2 in in vitro Zellkultursystemen an adulten, bovinen Chondrozyten getestet (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558). Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, wurde mit serumfreien Monolayer-Kulturen gearbeitet. Das BMP-2 stimulierte die Chondrozyten im Sinne einer anabolen Steigerung unter Stabilisierung des ursprünglichen, chondrozytären Phänotyps. Ein kataboler Einfluss ließ sich nicht feststellen. (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

Abb. 7 zeigt drei Wochen alte Chondrozytenkulturen, wobei 7a mit BMP-2 (1000 ng/ml) stimuliert wurde. Es ist gut zu erkennen, dass die Zellen unter der Wirkung von BMP-2 ihre chondrozytentypische runde und differenzierte Form behalten. Die Knorpelzellen aus Abb. 7b wurden mit fetalem Kälberserum (FCS) behandelt und zeigen eine abgeflachte und dedifferenzierte Zellmorphologie. (Hortschansky et al., 2002)

Abb. 8 verdeutlicht den zeitabhängigen Stimulationseffekt des BMP-2 auf die Glykosaminoglykansynthese von kultivierten bovinen Chondrozyten. (Hortschansky et al., 2002)

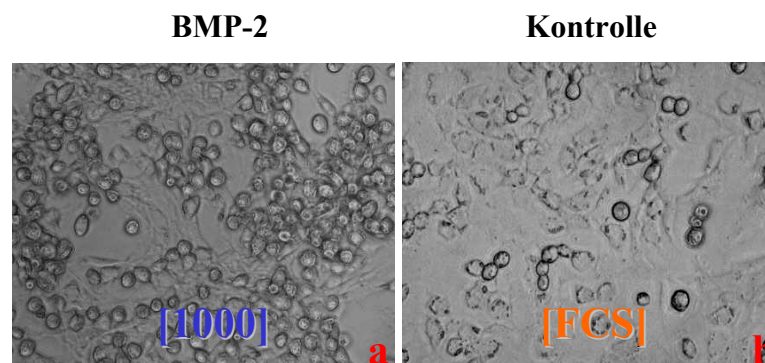


Abb. 7: 3 Wochen alte Kulturen von adulten bovinen Chondrozyten; die Zahl in der Klammer gibt die Konzentration des BMP-2 in ng/ml an; FCS = Fetales Kälberserum (Hortschansky et al., 2002)

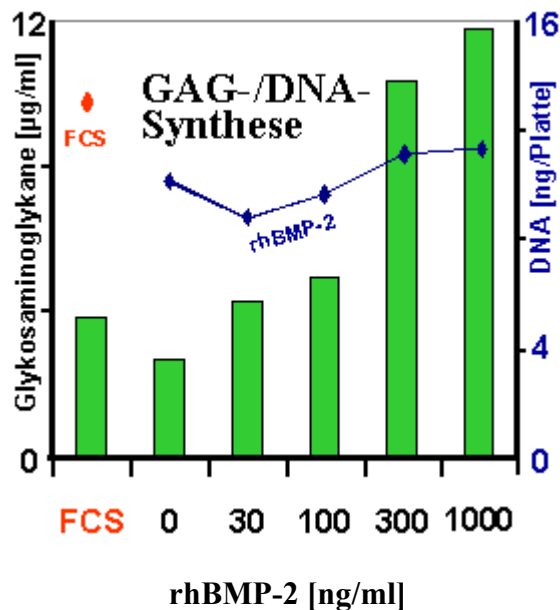


Abb. 8: Glykosaminoglykan- und DNA-Synthese unter BMP-2-Einfluß in bovinen Chondrozytenkulturen (Hortschansky et al., 2002)

Zur Messung der BMP-Freisetzung von Implantatoberflächen bzw. zur Bestimmung der BMP-Oberflächenaktivität wurde die rekombinant hergestellte extrazelluläre Domäne des Typ I BMP-Rezeptors (ALK-3 ECD) genutzt. Diese ist auf Grund der hochaffinen Bindung an funktionelle BMP-Homodimere eine geeignete Sonde zur Detektion von aktivem BMP, da für die Ausbildung von stabilen BMP/ALK-3 ECD Komplexen die intakte Tertiärstruktur der BMP-2-Homodimere (Cysteinknoten) zwingend erforderlich ist. Mittels Biosensor-Interaktionsanalyse unter Verwendung des Biacore 2000 Systems konnte die BMP-2 Desorptionskinetik in physiologischen Medien untersucht werden. Die direkte Bindung des BMP-2 an immobilisierte Rezeptordomänen ist über eine Standardkurve quantifizierbar (Abb. 9a). (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

Abb. 9b zeigt die BMP-2-Desorption von HA/TiAl₆V₄ Probekörpern in PBS durch einen Inhibitions-ELISA.

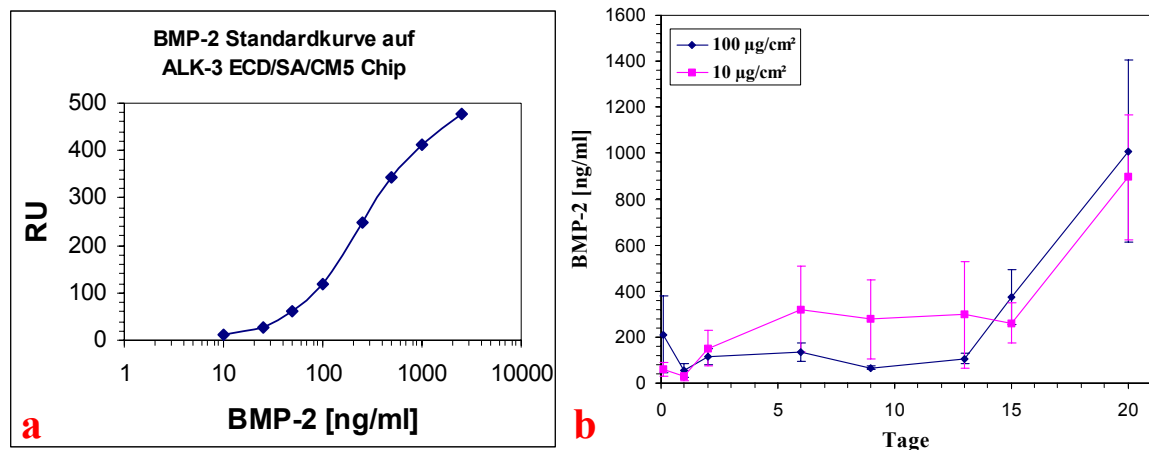


Abb. 9a und b: a) Eichkurve eines ALK-3 ECD Biochips (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558); b) BMP-2-Desorption von HA/TiAl₆V₄ Probekörpern in PBS (Inhibitions-ELISA) (Hortschansky et al., 2002)

Durch eine Biotinmarkierung der ALK-3-Rezeptordomäne konnten mit Hilfe eines Enzym-Avidin Konjugates auch Aussagen zur BMP-2-Aktivität auf der jeweiligen Trägermatrix getroffen werden (Abb. 10). (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

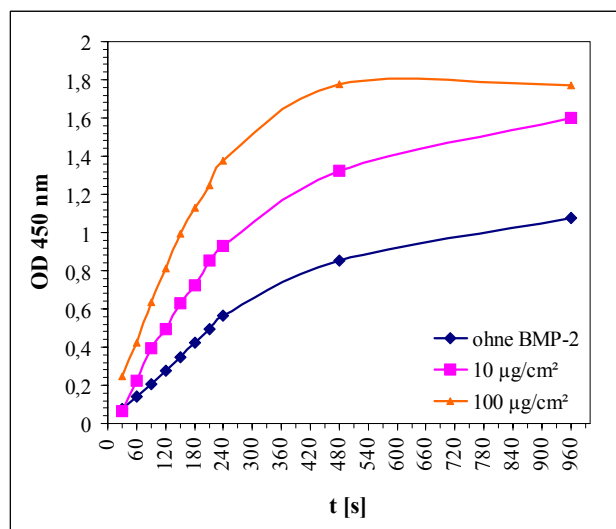


Abb. 10: Nachweis von bioaktivem BMP-2 auf der Oberfläche von HA/TiAl₆V₄ Probekörpern mittels biotinylierter ALK-3 ECD und Neutravidin-HRP Konjugat (BMBF-Schlussbericht AZ 0312558)

4.6 Spezielle Problematik-Experimentelle Zielsetzung

Es gibt viele tierexperimentelle Studien über mit Wachstumsfaktoren beschichtete Implantate (Hassan et al., 2003; Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003; Murakami et al., 2004). Meist mit dem Ergebnis, dass durch diese Faktoren allgemein Knochenwachstum induziert wurde (Vehof et al., 2001) oder dass die Implantateinheilung

verbessert wurde (Hassan et al., 2003; Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003; Murakami et al., 2004).

Die verwendeten Schafe hatten ein durchschnittliches Alter von zehn Jahren und waren allesamt weiblich. Die vorliegende Knochensituation dieser Tiere war stark osteoporotisch geprägt, mit erheblich reduzierter Spongiosa. Dies bedeutete, dass die Zylinder größtenteils in reines Fettmark implantiert wurden und anfangs nur im Bereich der Kompakta von Knochen umgeben waren. In Abb. 11a ist dieses Fettmark zu sehen. Ziel war es, in diesem Mark, in welchem primär keine Osteoblasten vorhanden waren, neuen Knochen zu induzieren.

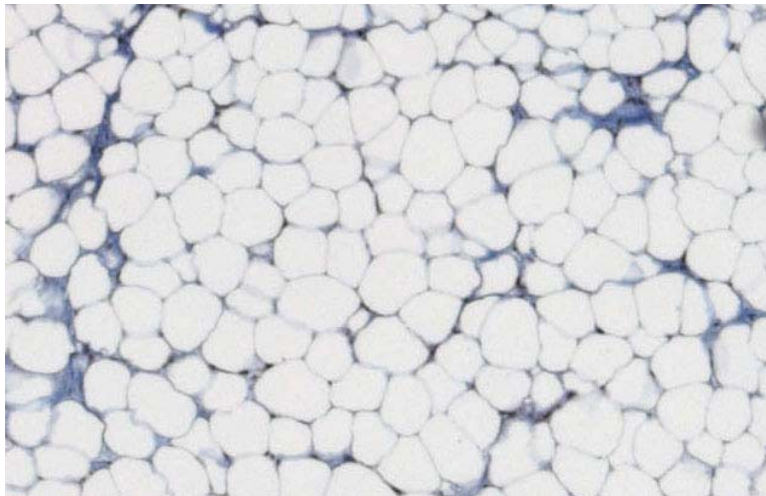


Abb. 11a: Knochenmark nach Masson-Goldner (Vergrößerung 8x5)

In bisherigen Studien (Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003; Murakami et al., 2004) wurden immer junge vitale Tiere verwendet, niemals aber solche alten mit der oben beschriebenen schwierigen Ausgangssituation. Zur Zeit ist also nicht bekannt, ob BMP-2 unter diesen Bedingungen neuen Knochen induzieren kann und eine schnellere Implantateinheilung erreicht wird als ohne.

Es soll durch diese Versuchsreihe eine prognostische Aussage der Wirkung von BMP-2 am osteoporotischen Knochen des alten Menschen getroffen werden, was durch bisherige Studien nur unzureichend möglich war.

5. Materialien

5.1 Geräte

Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH Tischaufoklav Axiolab
Brutschrank	Haraeus Instruments
Eismaschine	Scotsman FRIMON AF 80
Histokinette	Shanon Citodel 1000
Kamera	Digitalkamera AxioCam color, Zeiss (Basisauflösung 1300x1030)
Kühlplatte	Leica EG 1130
Kühlschrank -20°	Liebherr
Microtom	Microm Typ HM 355
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M
Universalprüfgerät „UPG 100“	Ralf Kögel, Leipzig
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte	Leica EG 1120
Wasser-Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF

5.2 Chemikalien

Essigsäure	Merck Z594862103, Darmstadt
Ethanol	Apotheke KIM
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA)	Merck S05581046, Darmstadt
Eukitt	Freiburg, Kindler R10-20/21-38
Glycerol	Merck K28649392106, Darmstadt
K-Mount Pulver Komponente 1	DiaTec, Hallstadt 9-019171
K-Mount Flüssigkeit Komponente 2	DiaTec, Hallstadt 9-019172
Osteodec	Manfred Fremdling-Krankenhaus und Laborbedarf. Fürth/Landshut
Paraffin	Paraplast Plus Sherwood Medical Co CaNo. 8889-502005
Paraformaldehyd	Merck K28306405040, Darmstadt

PBS (pH 7,2)	Merck, Darmstadt
8,06 mM Na ₂ HPO ₄	
1,47 mM KH ₂ PO ₄	
2,68 mM KCl	
137,00 mM NaCl	
Wasser	Wasser aus Umkehrosmose
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

5.3 Färbungen

Alizarin-S	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Anilinblauorange	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Eosin	Chroma GmbH & Co.
Hämatoxylin nach Gill	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Phosphomolybdänsäure-Orange G	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Säurefuchsin-Ponceau	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Weigerts Eisenhämatoxylin	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

5.4 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen 24x50, 24x24	Menzel
Objektträger	Superfrost Plus, beschichtet, Menzel

5.5 Computersoftware

Adobe Photo Shop 5.5	Adobe Systems, Inc.
Diagramme	SigmaPlot 2000 for Windows Version 6.00
Mikroskopsteuerung	Axiovert Vision 3.1, Carl Zeiss Vision GmbH

6. Methoden

6.1 Versuchsablauf

6.1.1 Kaninchen

Jedes Kaninchen bekam vier Implantate:

Verum: 1. Proximaler Femur links

Placebo: 1. Proximaler Femur rechts

2. Tibiakopf links

2. Tibiakopf rechts

Gruppe	Tiere	Standzeit	Beschichtung Verum	Beschichtung Placebo
1	10	7 Tage	Halbseitig HA + BMP-2	keine
2	10	21 Tage	Halbseitig HA + BMP-2	keine
3	10	42 Tage	Halbseitig HA + BMP-2	keine
4	10	100 Tage	Halbseitig HA + BMP-2	keine
5*	2	7 Tage	Beidseitig HA + BMP-2	Beidseitig HA
6*	2	21 Tage	Beidseitig HA + BMP-2	Beidseitig HA

Tab. 1: Übersicht der Kaninchengruppen; * diese Versuchsreihen begannen erst nach Abschluss der Übrigen

6.1.2 Schafe

Jedes Schaf bekam zwei Implantate:

Verum: Tibiakopf links (außer Schaf 1 und 2 lateraler Femurkondylus links)
beschichtet mit HA und BMP-2

Placebo: Tibiakopf rechts (außer Schaf 1 und 2 lateraler Femurkondylus rechts)
beschichtet mit HA

Tiere: 25 (18 ausgewertete)

Standzeit: 1 Tier 6 Wochen, 11 Tiere 9 Wochen, 5 Tiere 20 Wochen

Röntgen: Nach 6, 9 und 20 Wochen wurden Röntgenverlaufskontrollen durchgeführt
(in vivo)

6.2 Herstellung der Implantate

6.2.1 Kaninchenimplantate

Die eingesetzten Titanimplantate (Summenformel TiAl_6V_4) hatten eine Größe von 12 x 3 x 0,4 mm (Abb. 12a und 13). Bei allen verwendeten Implantaten wurde die Oberfläche beiderseits durch Sandbestrahlung aufgeraut. Die als Kontrollen benutzten Implantate sind in diesem Zustand belassen worden. Die anderen Metallplättchen wurden jedoch noch weiter bearbeitet. Sie erhielten eine Hydroxylapatitbeschichtung ($55 \pm 15 \mu\text{m}$), welche im Plasmasprayverfahren appliziert wurde, wobei diese allerdings immer nur auf einer Seite des Plättchens aufgetragen wurde. Ausgangsmaterial für die Beschichtung war das Hydroxylapatit Coating Powder CAMCERAM I der Firma CAM Implants, Leiden, Niederlande. CAMCERAM® HA Coating Powder ist definiert als $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$. Es besteht zu mindestens 98% aus Hydroxylapatit mit nicht mehr als 2% anderen Kalzium- oder Phosphatsalzen. Die Beschichtung in der Plasmaanlage erfolgte ohne Vakuum mit dem Edelgas Argon als Trägermedium. Im weiteren Verlauf erfolgte die Sterilisation aller Implantate. Als nächstes wurde auf die HA- Schicht steriles BMP-2 in einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufpipettiert. Bei einer zu beschichtenden Fläche von ca. 30 mm^2 entsprach dies einer durchschnittlichen Beschichtungsmenge von $6 \mu\text{l}$ BMP-2.

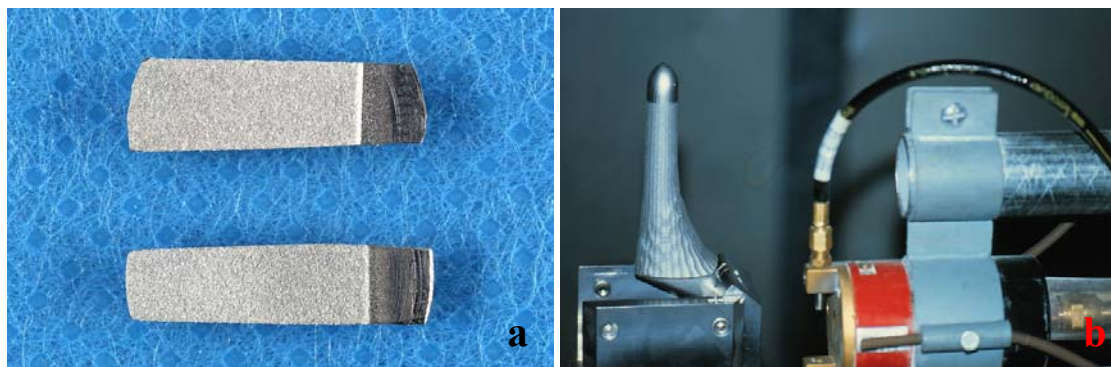


Abb. 12a und b: a) Kaninchenimplantate mit HA-Schicht; b) Plasmaanlage mit Hüftprothese

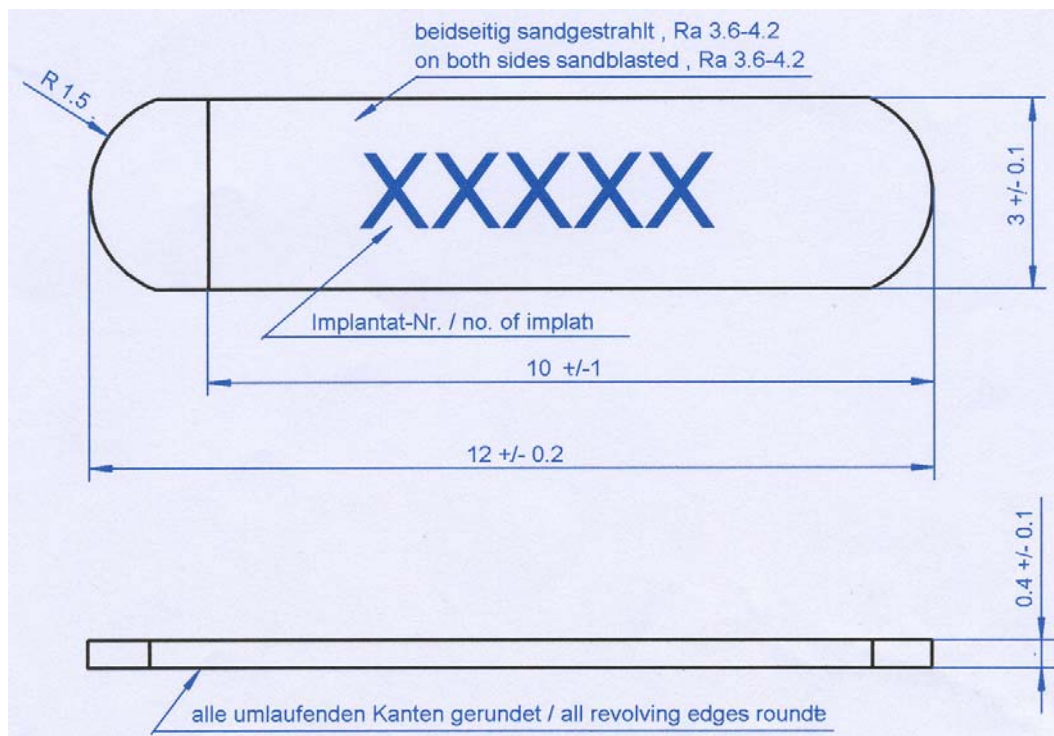


Abb. 13: Maßskizze des Kaninchenimplantats ohne HA-Schicht (Maßangaben in mm); Ra (Rautiefe absolut in μm) gibt die optimale Oberflächenrauigkeit für eine Beschichtung mit Hydroxylapatit an

6.2.2 Schafimplantate

Auch hier wurden speziell hergestellte Titanzylinder (Summenformel TiAl_6V_4) mit einer Höhe von 12 mm und einem Durchmesser von 10 mm verwendet (Abb. 14 und 15). Auf die Implantatoberfläche wurden eine ringförmige Nut mit den Maßen 4 mm breit und 1 mm tief und drei in der Längsachse verlaufende Einfräsungen unterschiedlicher Geometrie mit den Maßen 3 mm breit und 1 mm tief eingearbeitet. Dieses Negativprofil wurde geschaffen, um die Einheilung zu erschweren bzw. um zu sehen, ob das Knochenwachstum die größeren Distanzen überwindet und das Implantat dennoch integriert wird. Des weiteren erhielt jeder Zylinder in der Längsachse eine 4 mm große Gewindebohrung (M4), die intraoperativ mit zwei Stiftschrauben versehen wurde, um ein Einwachsen von Gewebe zu verhindern. Die Schrauben für die rechten Implantate waren etwas länger, so dass im Röntgenbild eine Unterscheidung zwischen Verum und Placebo möglich war. Benötigt wurde die Gewindebohrung zur Aufnahme der Ausziehvorrichtung für die späteren Ausreißversuche (siehe unten).

Jeder Zylinder erhielt auf seiner gesamten Mantelfläche zuerst eine Sandbestrahlung und danach eine $55 \pm 15 \mu\text{m}$ starke Hydroxylapatitbeschichtung mittels Plasmasprayapplikation (siehe 6.2.1). Grund- und Deckfläche blieben frei.

Anschließend folgte wiederum die Sterilisation. Auf die als Verum benutzten Zylinder wurde wieder steriles BMP-2 in einer Konzentration von $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufpipettiert (nur auf die Mantelfläche des Zylinders). Bei einer zu beschichtenden Fläche von ca. 380mm^2 entsprach dies einer durchschnittlichen Beschichtungsmenge von $76\mu\text{l}$ BMP-2. Die als Kontrollen verwandten Implantate wurden nur mit dem Lösungsmittel des BMP-2 (kein BMP-2 enthalten) beschichtet.



Abb. 14: Schafimplantat mit HA-Schicht

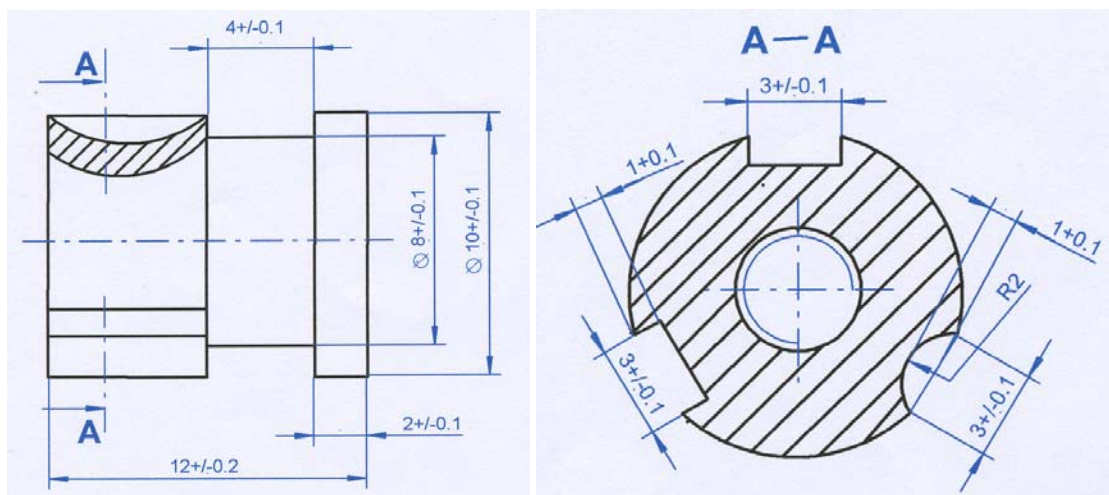


Abb. 15: Maßskizze des Schafimplantats ohne HA-Schicht (Maßangaben in mm)

6.3 Operationstechnik mit Einbringen der Implantate

6.3.1 Kaninchen

44 Kaninchen der Rasse New Zealand wurden operiert, wobei jedes Kaninchen vier Implantate erhielt: zwei im Femur und zwei in der Tibia. Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin im Verhältnis 4:1 intravenös narkotisiert und im Bereich von Femur und Tibia rasiert. Danach wurden die Tiere mit Desinfektionsmittel gewaschen und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Der operative Zugang erfolgte für jedes

Implantat über einen lateralen Hautschnitt von ca. 1,5 cm Länge immer direkt über der Implantationsstelle im Knochen. Bis zur Knochenoberfläche wurde stumpf weiterpräpariert. Jeweils proximal wurde in Femur und Tibia das Implantatbett eingesägt mit anschließender Platzierung des Implantates darin. In die Schlitzte der linken Seite kamen die BMP-2-beschichteten Plättchen und in die der rechten Seite die unbeschichteten ausschließlich sandgestrahlten Plättchen als Kontrolle. Die Wunde wurde in zwei Schichten einschließlich der intrakutanen Hautnaht verschlossen und mit Aluminiumspray versiegelt. Die korrekte Lage der Implantate wurde mit Röntgenaufnahmen kontrolliert. Nach zehn Tagen wurden die Fäden gezogen.





Abb. 16: Operationsablauf beim Kaninchen

6.3.2 Schaf

Insgesamt wurden 25 Tiere operiert, wobei alle jeweils zwei Implantate erhielten. Als Implantationsorte waren anfangs die lateralen Femurkondylen rechts wie links vorgesehen. Ab dem dritten Tier erfolgte die Implantation rechts wie links in die proximale Tibia. Jedes Schaf erhielt zur Kurznarkose eine intramuskuläre Ketamininjektion. Danach wurde das Schaf für die Operation vorbereitet, wobei die Narkose mittels Halothanbeutel plus Sauerstoffgabe aufrechterhalten wurde. Jedes Tier bekam einen zentralvenösen Zugang und einen arteriellen zur Blutdruckmessung gelegt. Weiterhin wurde das Op-Gebiet geschoren und anschließend mit Enthaarungscreme vollständig von Haaren befreit. Als nächstes erfolgte die Rückenlagerung des Tieres mit intratrachealer Intubation mit vorheriger intravenöser Propofolgabe zur Relaxation. Abschließend wurde das Op-Gebiet steril abgewaschen und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Haut wurde medial in Höhe der Tuberositas Tibae mit einem ca. 5 cm langen Schnitt eröffnet. Zur Blutstillung wurde ein Elektrokauder benutzt. Die Präparation bis zur Knochenoberfläche wurde erst mit dem Messer und dann mit dem Rasparatorium vorgenommen. Danach wurde mittels Präzisions-Diamantfräse das Implantatbett medial etwa 3 cm unter dem Tibiaplateau in Höhe der

Tuberositas Tibiae gefräst, in welches dann der Zylinder, mit der zirkulären Nut voran, eingesetzt wurde. Links war wiederum der BMP-2-beschichtete, rechts lag der ausschließlich hydroxylapatitbeschichtete Zylinder. Der Wundverschluss erfolgte in drei Schichten einschließlich der intrakutanen Hautnaht mit abschließender Versiegelung durch Aluminiumspray. Auch hier wurden Röntgenaufnahmen zur Lagekontrolle angefertigt. Die Fäden wurden nach zehn Tagen gezogen.





Abb. 17: Operationsablauf beim Schaf

6.4 Entnahme der Implantate und ihre Weiterverarbeitung

Die Kaninchen waren in vier Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt, wobei die Liegezeit der Implantate 7, 21, 42 und 100 Tage betrug. Getötet wurden die Tiere durch eine Barbituratüberdosierung und Femur und Tibia wurden beidseits mit erhaltener gelenkiger Verbindung im Kniegelenk herauspräpariert. Die frischen Knochen wurden auf Eis fixiert und in unser Labor transportiert. Im Anschluss daran erfolgte die sofortige Fixierung in vierprozentigem Paraformaldehyd. Zu gegebener Zeit wurden Femur und Tibia voneinander getrennt und überschüssiges Weichteilgewebe vom Knochen entfernt. Nachdem die Knochen geröntgt (siehe unten) waren, wurden die Implantate mit einem kleinen Knochenrest aus dem ursprünglichen Knochen herausgesägt. Das Sägeblatt stand dabei parallel zur Längsachse und senkrecht zur Oberfläche des Implantats. Im Idealfall ist bis an das Metall herangesägt worden. Diese Sägemethode war für den anschließenden Dünnschliffprozess notwendig. Die zugesägten Proben wurden jetzt in PBS eingelegt.

Die Schafe wurden durch eine Überdosis Barbiturat und anschließender intravenöser Magnesiumsulfatinjektion getötet. Es erfolgte die Entnahme der Tibiae oder Femur und die sofortige Fixierung auf Eis. Im Labor wurde das Implantat in einem Knochenblock mit einer Größe von ca. 2 x 2 x 2cm herausgesägt. Dieser Block wurde dann ebenfalls in vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert.

6.5 Auswertungsverfahren

6.5.1 Röntgen

6.5.1.1 *Kaninchen*

Von allen Knochen wurden konventionelle Röntgenaufnahmen auf Mammografiefilmen angefertigt. Die verwendete Energie betrug 52 keV bei 5,0 mAs. Es wurde versucht die Knochen so einzustellen, dass die Implantate mit ihrer Längsachse senkrecht und mit ihrer Oberfläche parallel im Strahlengang lagen. Für eine bessere Größendarstellung und feinere Auflösung ist teilweise auch das Mammografiegerät genutzt worden. Des weiteren dienten die Aufnahmen zur genauen Lokalisation des Plättchens für das Sägen zur Dünnschliffherstellung.

6.5.1.2 *Schaf*

Anders als die Kaninchen wurden die Schafe auch während der Versuchslaufzeit unter Kurznarkose geröntgt. Die Schafe erhielten zur Immobilisation eine intramuskuläre Ketamininjektion. Über einen anschließend gelegten zentralvenösen Zugang wurde die Kurznarkose durch Propofolgaben aufrechterhalten.

Neben dem postoperativen Bild wurde noch in der sechsten, in der neunten und in der zwanzigsten Woche geröntgt, um eine Kontrolle über den Verlauf der Knocheneinheilung anzufertigen. Durch diese Kontrollaufnahmen konnte der Tötungszeitpunkt exakt festgelegt werden. Allerdings wurde bei diesen Kontrollaufnahmen, um die Narkose nicht unnötig zu verlängern, jedes Implantat nur einmal in der Längsachse geröntgt.

Nach der Entnahme wurden die gesägten Knochenblöcke nochmals geröntgt. Verwendet wurden dieselben Parameter wie bei den Kaninchen. Zum Teil ist die Energie auf 55,5 KeV bei 5,5 mAs erhöht worden, um eine bessere Abbildung bei höherer Mineralisation zu ermöglichen. Die Darstellung des Implantates erfolgte in allen drei Ebenen des Blockes.

Das heißt zwei Bilder entstanden in der Längsachse um 90 Grad zueinander gekippt. Das dritte Bild zeigte das Implantat in seiner zirkulären Form (Abb. 18).

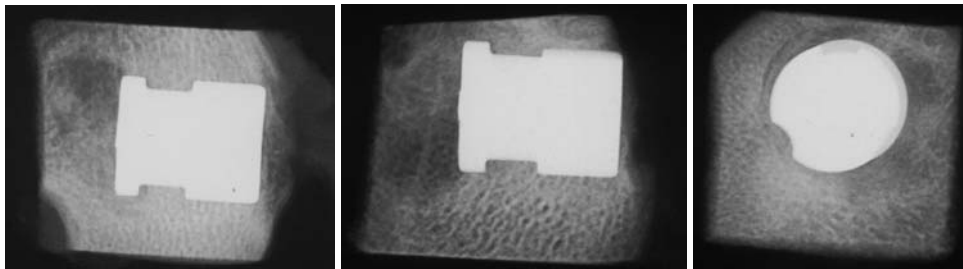


Abb. 18: Röntgenmodus eines Schafzylinders)

6.5.2 Histologie

Für die Herstellung der Präparate zur histologischen Auswertung gab es zwei verschiedene Verfahren.

6.5.2.1 Dünnschliffe

Zuerst wurden die endgesägten Proben von Kaninchen und Schaf in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dazu lagen sie jeweils zwei bis drei Tage (je nach Größe der Proben) in 50%igem, 70%igem, 80%igem, 96%igem und zweimal in 100%igem Alkohol. Danach erfolgte eine Infiltration in lichtundurchlässigen Gefäßen: erstens 2 bis 3 Tage mit einem Alkohol-Technovit-Gemisch (1:1) und zweitens 3 bis 4 Tage mit Technovit 7200. Anschließend sind die Stücke in Technovit 7200 eingebettet worden. Daran schloss sich eine zweistufige Polymerisation mit einem EXAKT-Polymerisationsgerät an. Zuerst wurde 4 Stunden mit niedriger Lichtintensität (gelbes Licht) und danach 6 Stunden mit hoher Lichtintensität (blaues Licht) polymerisiert. Die ausgehärteten Technovitblöcke sind dann mit Technovit 4000 auf Objektträger (vorher Schichtdicke bestimmt) geklebt und mit dem EXAKT-Trennschleifsystem bei der gewünschten Schnittstelle abgesägt worden. Die Schnittflächen wurden dann plangeschliffen sowie die Gesamtschichtdicke vermessen und auf neue Objektträger, an denen vorher ebenfalls die Schichtdicke gemessen wurde, planparallel aufgeklebt. Dazu wurde der Präzisionskleber Technovit 7210 und die EXAKT-Präzisionsklebepresse, die mit Druck und Blaulicht arbeitet, genutzt. Durch Vermessen der Schichtdicke des gesamten „Sandwichs“ konnte mit Hilfe der anderen Messwerte die Schichtdicke des Klebers ermittelt werden. Danach erfolgte die Herstellung der Trennschliffe durch Auseinandersägen des „Sandwichs“. Die Trennschliffe hatten jetzt

einschließlich Kleber eine Schichtdicke von ca. 150 – 300µm. Die Herstellung der endgültigen Dünnschliffpräparate erfolgte stufenweise mit Sandpapier unterschiedlicher Körnungen mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem und folgender Polierung. Das Ergebnis waren Präparate mit einer Schichtdicke zwischen 5 und 15 µm.

6.5.2.2 Konservativ hergestellte Gewebsschnitte

Dieses Verfahren wurde ausschließlich für die Schafshistologie angewandt. Hierzu sind die Blöcke in Osteodec[®] entkalkt worden und danach längs in zwei Hälften geschnitten worden (z. T. auch erst in zwei Hälften gesägt und dann entkalkt). Mit dem Microtomgerät sind dann 6µm dicke Schnitte entstanden, die anschließend mit verschiedenen Methoden gefärbt wurden (siehe unten).

6.5.2.3 Färbung der Gewebspräparate

6.5.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach dieser Methode sind nur die konservativ hergestellten Gewebsschnitte gefärbt worden.

Zuerst wurden die Schnitte 10min mit Hämatoxylin gefärbt und danach mit warmem Leitungswasser gebläut. Als nächstes erfolgte die ebenfalls 10min dauernde Färbung mit Eosin. Dann wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 50 – 100% und anschließend durch Xylol geführt. Abschließend wurde jedes Präparat noch mit Eukitt und einem Deckglas eingedeckt.

6.5.2.3.2 Masson-Goldner-Färbung

Diese Art der Färbung wurde sowohl bei den Dünnschliffen als auch bei den entkalkten Schnitten verwendet.

Als erstes wurden die Präparate 20 min in Weigerts Eisenhämatoxylin gelegt und danach zweimal mit aqua dest. (a. d.) gespült. Dann erfolgte die zwanzigminütige Färbung mit Säurefuchsin und danach wiederum zweimal eine Spülung mit einprozentiger Essigsäure. Jetzt wurden die Präparate noch 20 min in Phosphormolybdänsäure gelegt und mit einprozentiger Essigsäure etwas länger ausdifferenziert. Anschließend wurden sie 8 min lang in Anilinblau gelegt. In einigen Fällen wurde nur 6 min gefärbt, da in den

„Achtminutenpräparaten“ der kompakte Knochen sehr stark blau gefärbt war. Nach der Anilinblaufärbung folgte noch eine Spülung mit a. d. Danach wurden die Präparate wie schon bei der HE-Färbung durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 50 – 100% und anschließend durch Xylol geführt. Abschließend wurde jedes Präparat wieder mit Eukitt und einem Deckglas eingedeckt.

6.5.2.3.3 *Alizarin-S-Färbung*

Diese Färbung weist Calciumionen nach. Das heißt sie ist nur bei Nativpräparaten und den Dünnschliffen und nicht bei vorher entkalkten Präparaten anwendbar.

Einige Tropfen der Alizarinlösung (pH 4) wurden auf die Dünnschliffe gegeben. Als diese getrocknet waren, wurden sie kurz in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckt.

6.5.2.4 *Mikroskopische Untersuchung*

Für die histologische Auswertung wurde das Mikroskop AXIOVERT 200M mit AXIOCAM color und der dazugehörigen Software AXIOVISION 3.1 verwendet. Gearbeitet wurde mit folgenden Objektiven: 5, 10, 20, 40 und einer Lupenvergrößerung von 1,25. Das Okular hatte eine feste Vergrößerung von 8. Die Bildvergrößerung in den Ergebnissen ist entweder als Faktoren aus Okular- und Objektivvergrößerung (z. B. 8x10 bedeutet 160fache Vergrößerung, wobei der Wert 8 sich immer auf das Okular bezieht) oder als Produkt beider Vergrößerungen angegeben (z. B. 160 bedeutet 160fache Vergrößerung). Fast alle Betrachtungen und Bildaufnahmen wurden in Hellfeldmikroskopie durchgeführt, bei ausgewählten Ausschnitten auch mit Phasenkontrast oder Fluoreszenz (mittels Blauanregung und Detektion wie Fluorescein).

6.5.3 *Ausrissversuche*

Dieses Verfahren wurde nur für die Schafsimplantate eingesetzt. Hierbei wurde die Zugkraft (oder Ausrisskraft) gemessen, die nötig war, um das Implantat im Knochenblock zu lockern. Die Zugkraft ist ein direktes Maß für die Innigkeit der Verbindung zwischen Implantat- und Knochenoberfläche.

Untersucht werden sollte, ob die Zugkraft mit der Standzeit zunimmt und ob sie sich bei BMP- und Kontrollzylindern unterscheidet.

Diese biomechanische Testung wurde bei insgesamt 12 Tieren durchgeführt. Einerseits nach 9 Wochen (7 Tiere), als die Röntgenbefunde die Anwesenheit von erster Knochenneubildung indizierten, sowie nach 20 Wochen (5 Tiere), als die Einheilung als abgeschlossen betrachtet werden konnte.

Für die Versuche kam das Universalprüfgerät „UPG 100“ (siehe Abb. 19) der Firma Ralf Kögel, Leipzig in Kombination mit dem y-t Recorder „endim 621.02“ zum Einsatz. Dieser ist vor Versuchsbeginn durch definierte Prüfdosen aus dem Institut für Materialwissenschaft und Werkstofftechnologie, Jena, geeicht worden.

Die gleich nach der Tötung entnommenen Präparate, wurden auf Eis zur Testanlage transportiert und sofort analysiert. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden alle Präparate quaderförmig in immer gleichen Dimensionen von 20 x 20 x 20 mm gesägt. Die noch nativen Knochenblöcke wurden mit einer Ausrichtvorrichtung exakt vertikal in einen Kunststoffbecher abgesenkt und in einem Zweikomponentenkunstharz (K-Mount) auf Methylmethacrylatbasis eingegossen. Da bei der Aushärtung Wärme entstand und diese nicht das vitale Knochengewebe gefährden sollte, fand diese im Kühlraum bei +5 Grad Celsius statt. Dieser Prozess dauerte etwa 30min, wobei der Knochenblock sicher fixiert wird. Die Vitalität des Knochens um das Implantat herum wurde nicht beeinträchtigt. Mit Hilfe einer eigens entworfenen und hergestellten Versuchsanordnung und des oben beschriebenen UPG wurden die Implantate aus dem Knochen herausgezogen. Dafür wurde der Zylinder über die vorhandene Gewindebohrung durch eine Zugstange mit der Prüfmaschine verbunden und auf dem Gegenhalter der Anlage festgespannt. Unter Maximalkrafteinstellung von $F_z = 2,5 \text{ KN}$ für die Präparate der 9-Wochentiere und von $F_z = 5 \text{ KN}$ für die Präparate der 20-Wochentiere erfolgte der Ausriss der Implantate. Die Untersuchung wurde mit konstanter Zuggeschwindigkeit von 6,5mm/min durchgeführt. Entweder wurde dann bis zum kompletten Auszug des Implantates aus dem Knochenblock oder nur bis kurz nach Erreichen der notwendigen Ausrisskraft (Maximalkraft) gezogen. Im zweiten Fall (wurde ab dem 6. Versuch eingesetzt) verblieb das Implantat im Knochenblock. Diese Variante wurde gewählt, um die entstandene knöcherne Struktur so wenig wie möglich zu beschädigen, da noch eine histologische Untersuchung anstand. Insbesondere konnten dadurch Implantate für die Dünnschlifftechnik gewonnen werden. Gemessen wurde die in axialer Zugrichtung notwendige Kraft, die zum initialen Abriss der Knochen-Implantatverbindung erforderlich war. Die jeweils einwirkende Kraft wurde als Kraft-Weg-Diagramm über den oben genannten geeichten Schreiber aufgezeichnet. Aus den einzelnen Ausgangswerten der maximalen Messbereichskraft, dem Gewicht des

Vorrichtungsmes, dem Gewicht der Probe und der gemessenen Ausrisskraft wurde die erreichte absolute Ausrisskraft errechnet.



Abb. 19: Eingegossenes Implantat und Versuchsaufbau

7. Ergebnisse

7.1 Kaninchenversuche

7.1.1 Radiologie

Vergleichbare Ergebnisse waren den Röntgenbildern der Kaninchen nicht zu entnehmen. Allerdings dienten sie auch in erster Linie der genauen Lokalisation des Plättchens für die Dünnschliffherstellung.

In den beiden jüngeren Gruppen (7-,21-Tage) erkennt man noch deutlich den Sägespalt vom Einbringen der Implantate (siehe Pfeile in Abb. 20). Neu gebildeten Knochen erkennt man in diesen Bildern eher nicht, da diese geringe Mineralisation nicht im Röntgenbild erfassbar ist. In den älteren Gruppen (42-,100-Tage) ist der Sägespalt zumeist verstrichen, was auf einen Anbau von Knochen hinweist (siehe Pfeile in Abb. 20).

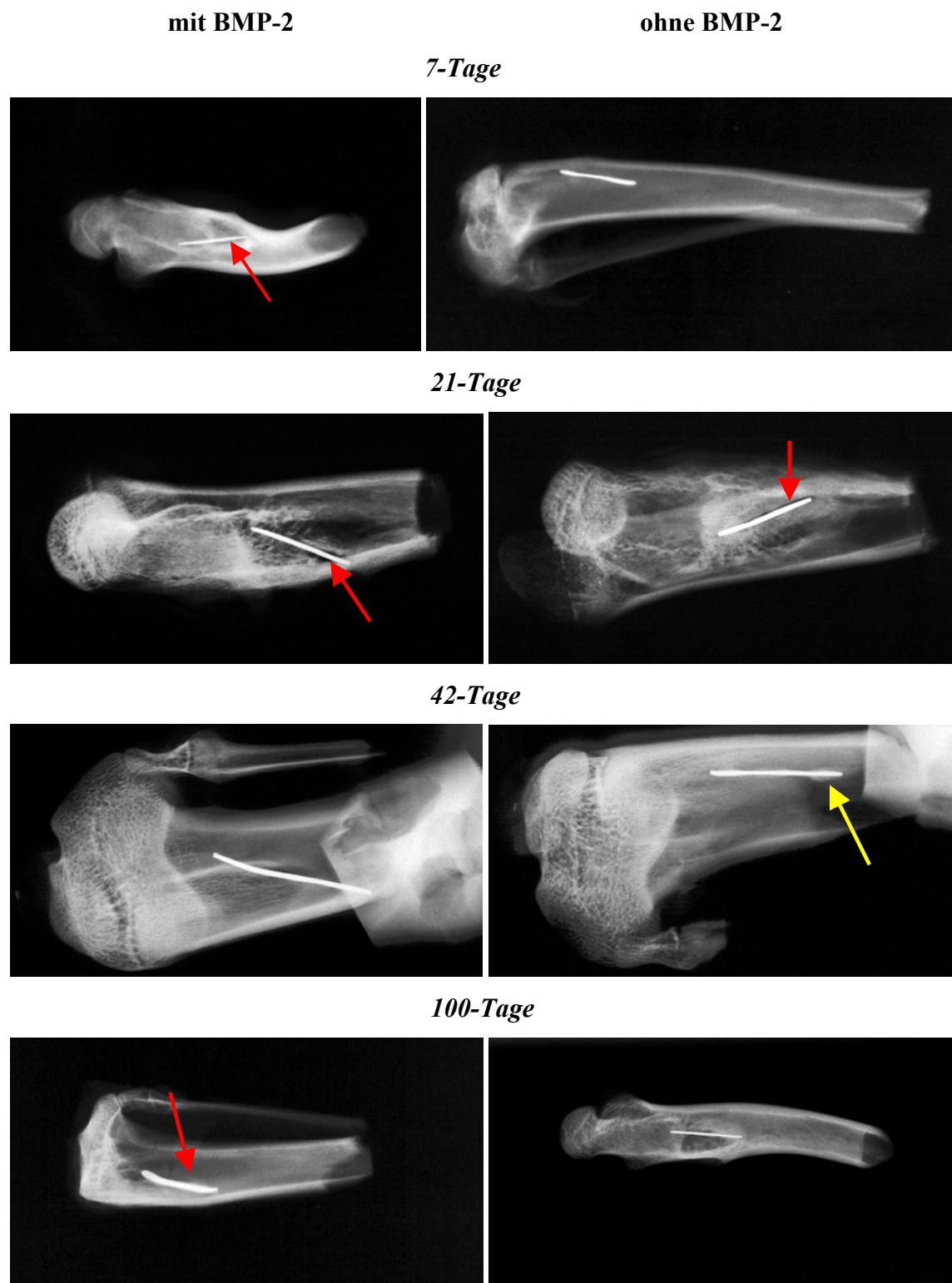


Abb. 20: Radiologische Einheilungsstadien beim Kaninchen; links ist das Verum, rechts das Placebo zu sehen

7.1.2 Histologie

Eine toxische Wirkung des BMP-2 konnte in den Dünnschliffen nicht nachgewiesen werden. Die Dünnschliffe der 7-Tage- und der 21-Tagegruppe zeigten, dass die kombinierte HA-BMP-2-Beschichtung zu einer enormen Steigerung des Knochenstoffwechsels gegenüber der völlig unbeschichteten Seite im selben Präparat führte. Im nachhinein stellte sich heraus, dass kein Rechts-Linksvergleich durchgeführt werden musste, sondern schon der Vergleich der zwei Implantatseiten in einem Schnitt diesen Unterschied zeigte.

Abb. 21 zeigt ein halbseitig HA-BMP-2 beschichtetes Implantat. Wobei diese Aufnahme nicht im Mikroskop entstand, sondern mit der Makrolinse einer Fotokamera. Schon in dieser geringen Vergrößerung zeigt sich auf der beschichteten Seite entlang des Implantats ein dünner blauer Streifen (siehe Pfeile). Dabei handelt es sich um neugebildeten Knochen. Auf der anderen Seite fehlt dieser Streifen. Hier ist vor allem im mittleren Implantatteil eine stärkere Bindegewebsreaktion zu sehen. Die auf der unbeschichteten Seite erkennbaren größeren Knochenbälkchen sind zum Teil Bruchstücke vom Sägen oder schon vorher gebildeter Knochen.

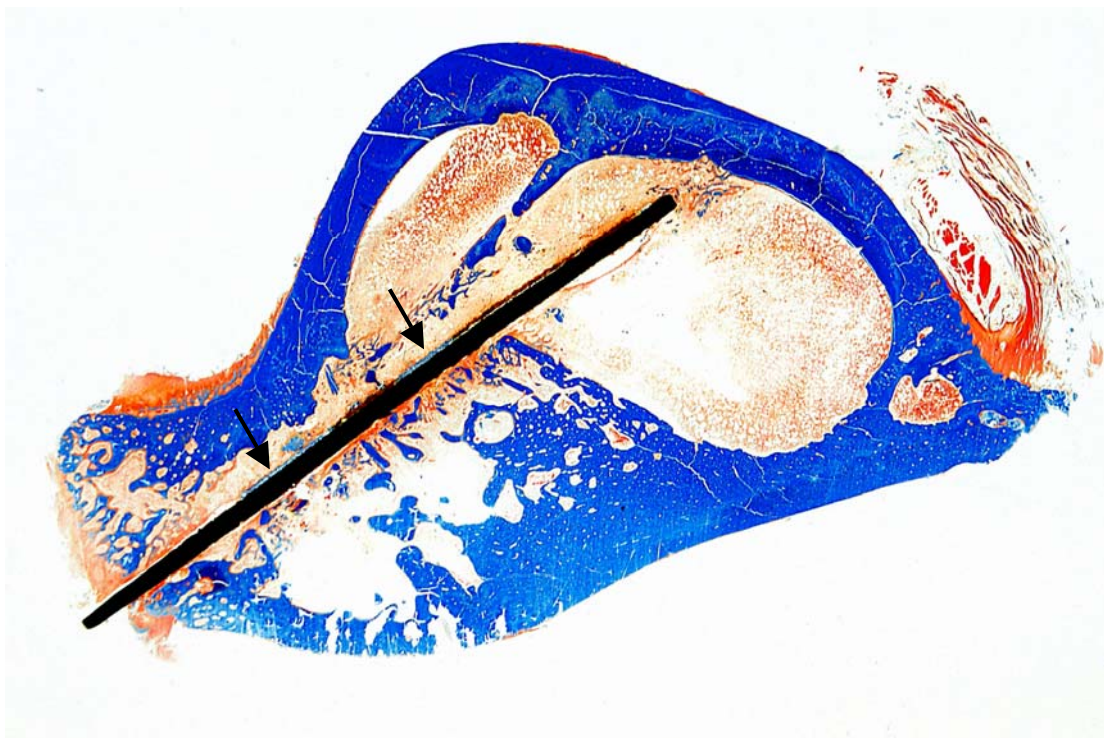


Abb. 21: Fotografierte Übersicht eines 7-Tageimplantates nach Masson-Goldner; beschichtete Seite ist oben

In Abb. 22 sind 40fach vergrößerte Aufnahmen mit halbseitiger Beschichtung dargestellt. Auch hier ist die Knochenbildung nur auf der beschichteten Seite zu sehen (Pfeil 1). Auf der Gegenseite erkennt man nur die schon oben genannte Bindegewebsreaktion (Pfeil 2). Der Spalt zwischen Implantat und Gewebe auf der unbeschichteten Seite in Abb. 22d entsteht durch Schrumpfung während der Alkoholreihe vor der Färbung zur Dünnschliffherstellung.

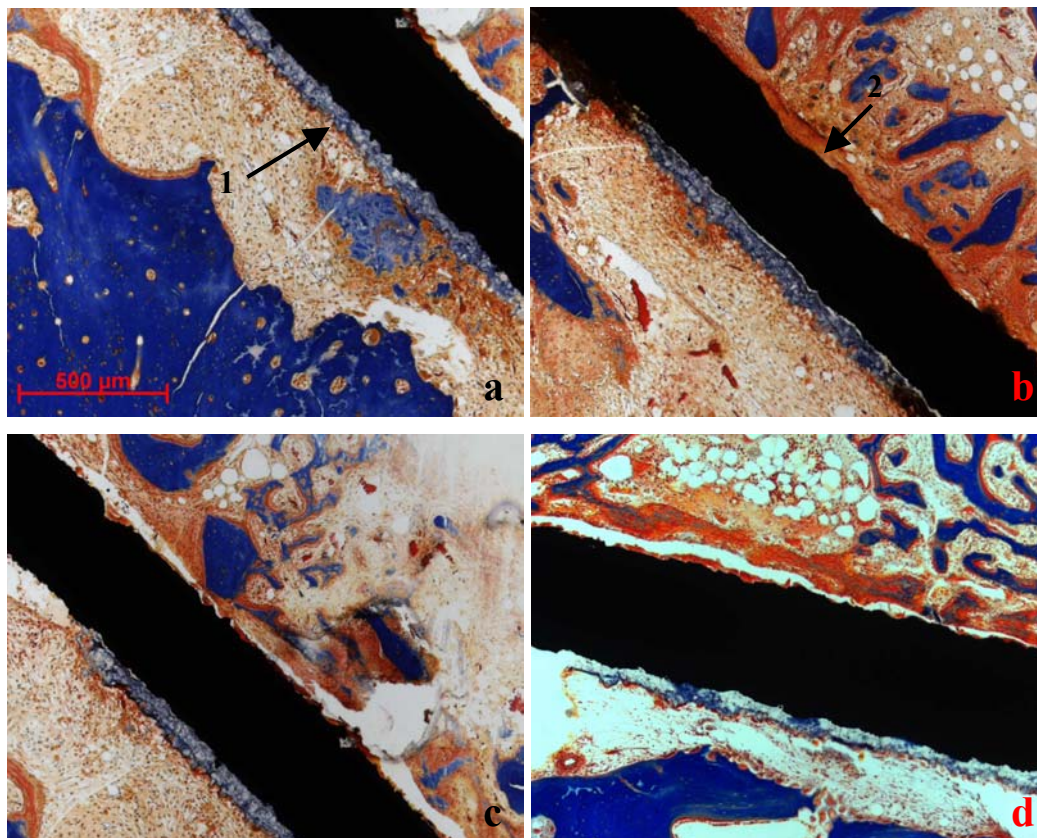


Abb. 22a-d: 7-Tageimplantate mit 40facher Vergrößerung und halbseitiger Beschichtung nach Masson-Goldner; beschichtete Seite ist im Bild unten

In den folgenden Bildern wird der Unterschied zwischen beschichteter, also HA und BMP-2, gegenüber der völlig unbeschichteten Seite noch deutlicher. Die Abb. 23a-d zeigen die beschichtete Seite in unterschiedlichen Vergrößerungen. Abb. 23a verdeutlicht neben dem am Implantat anhaftenden Knochen, welche zelluläre Aktivität sich hier in unmittelbarer Nähe des Implantates vorfinden lässt. Nebeneinander sind knochenaufbauende durch Osteoblasten (Pfeil 1) und knochenabbauende Vorgänge durch Osteoklasten (Pfeil 2) zu erkennen. Abb. 23b und c sind Ausschnitte aus 23a. In 23b sind durch die Vergrößerung die feinen Knochenbälkchen des neugebildeten Knochen gut zu sehen. Außerdem sind in diesem Bild die knochenbildenden Osteoblasten direkt am neuen Knochen zu beobachten.

Abb. 23c zeigt stark vergrößerte Osteoklasten bei der Arbeit. Abb. 23e und f zeigen die unbeschichtete Seite des Implantats. Knochenmodulierende Zellen fehlen hier weitgehend. Auch neu gebildeter Knochen, wie auf der Gegenseite ist nicht vorhanden, lediglich schon vorher da gewesene Bruchstücke. Nur in Abb. 23e ist ein kleiner Knochensplitter zu sehen, der Kontakt zum Implantat aufnimmt. Sonst lagert sich den Metallplättchen hier nur fibrinöses Gewebe an.

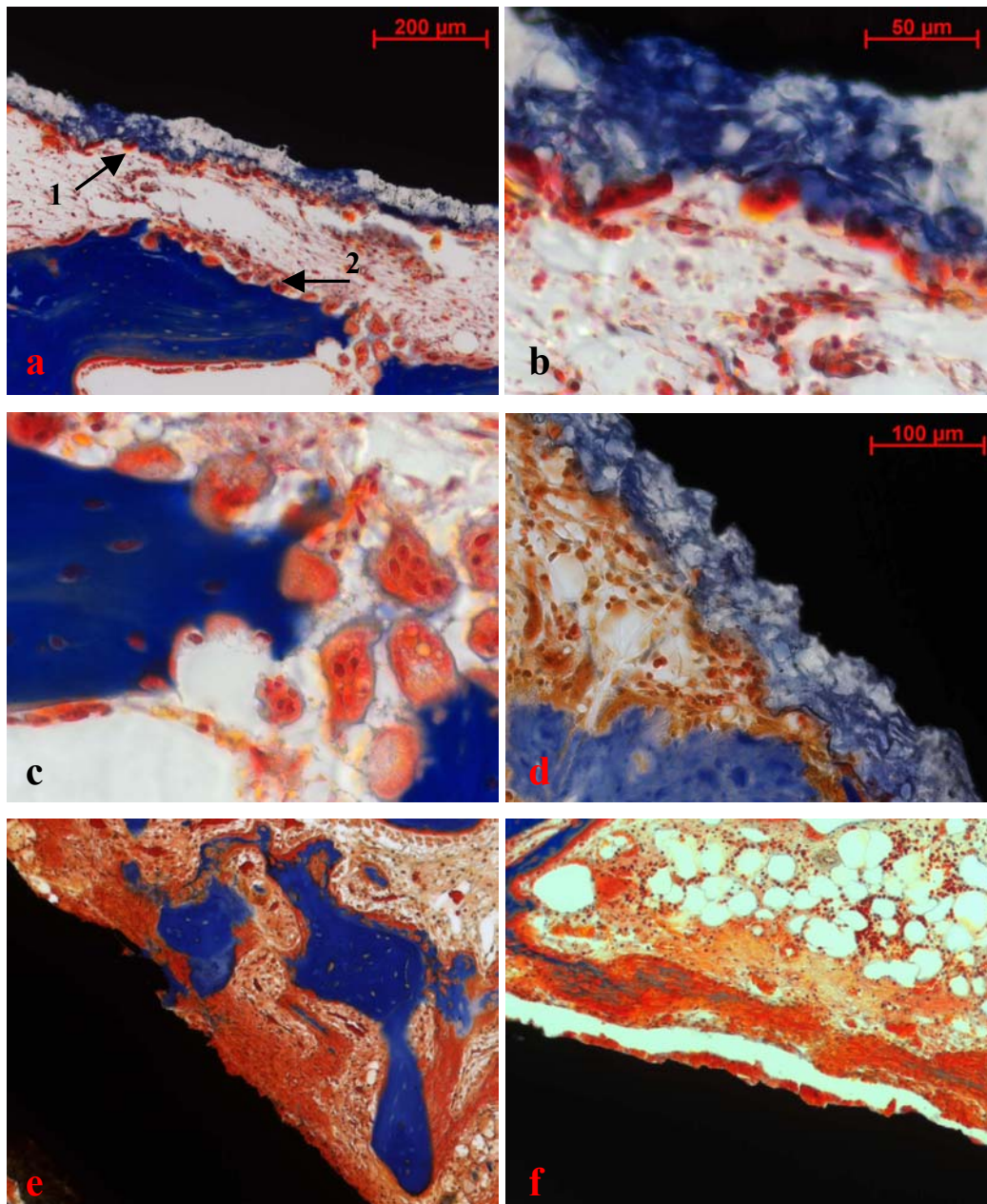


Abb. 23a-f: 7 Tage; a – d zeigen die beschichtete Seite in den Vergrößerungen 80 (a), , 320 (b, c) 160 (d); e und f zeigen die unbeschichtete Seite in 80facher Vergrößerung; Färbung nach Masson-Goldner

Eine weiteres Ergebnis war die Beobachtung von Implantaten in Wachstumsfugen. Diese Positionierung des Plättchens im Knochen und der dazugehörige Schliff gelang zufällig bei einem 7-Tage- und einem 21-Tagetier. Interessant war hier der Einfluss der Implantatbeschichtung auf das Verhalten der Knorpelzellen der Wachstumsfuge. Abb. 24 zeigt einen Dünnschliff beim 7-Tagetier. In Abb. 24a ist die Lage des Implantats innerhalb der Wachstumsfuge gut zu erkennen. Die beschichtete Seite befindet sich im Bild gesehen oben. Abb. 24b zeigt die Neuorientierung der Knorpelzellen auf der beschichteten Seite (Pfeil). Normalerweise ist die Verknöcherungszone oben, der unreifere Knorpel unten. Knapp über dem Implantat aber kommt es wiederum zu einer Knorpelzellhypertrophie. Das bedeutet, die unreiferen Chondrozyten müssen durch das HA und BMP-2 stimuliert worden sein, dass sie nun auch in entgegengesetzter Richtung hypertrophieren. Besonders in Abb. 24c ist die Änderung der Ausrichtung der Knorpelsäulen von anfangs vertikal nach horizontal zum Implantat zu sehen. Auf der unbeschichteten Seite hingegen (Abb. 24a und d) ist dieser Effekt der Umorientierung nicht vorhanden.

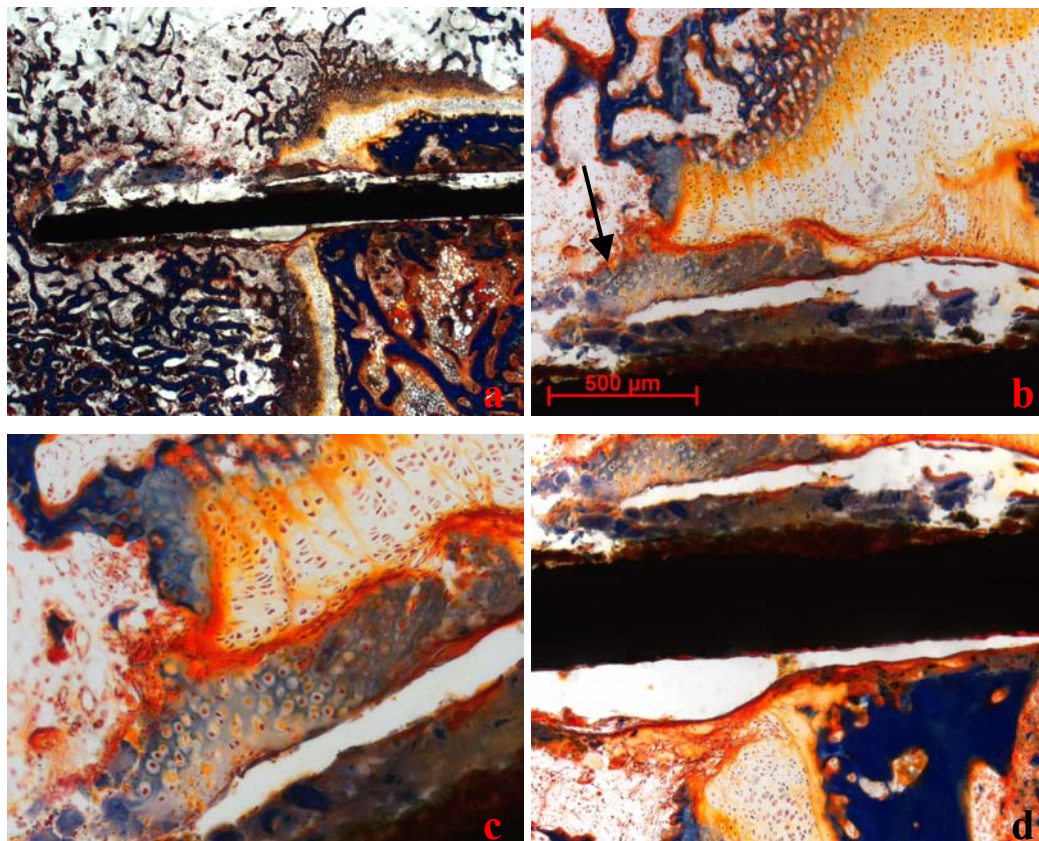


Abb. 24a-d: 7 Tage; a zeigt eine Übersicht in 10facher Vergrößerung (beschichtete Seite oben); b und c zeigen die beschichtete Seite in den Vergrößerungen 40 (b) und 80 (c); d zeigt die unbeschichtete Seite (unten) in 40facher Vergrößerung; Färbung nach Masson-Goldner

Wichtig in diesem Knochenbildungsprozess war zu beweisen, ob der neugebildete Knochen nach sieben Tagen auch tatsächlich schon mineralisierte Anteile aufweist. Denn die Masson-Goldner-Färbung kann nicht zwischen mineralisiertem und unmineralisiertem Osteoid unterscheiden. Der Beweis gelang mit der Alizarin-S-Färbung. Diese Färbung ist calciumspezifisch. Das heißt der Farbstoff bindet nur an calciumhaltige Materialien, also auch an mineralisierten Knochen, welche dann rötlich erscheinen.

In Abb. 25 erkennt man die rotgefärbten mineralisierten Knochenanteile auf der beschichteten Implantatseite (unten im Bild; siehe Pfeil) deutlich. Zum anderen ist auch graues Material zu sehen, welches das HA darstellt, in dem sich kein Knochen gebildet hat (oder zumindest kein mineralisierter Knochen).

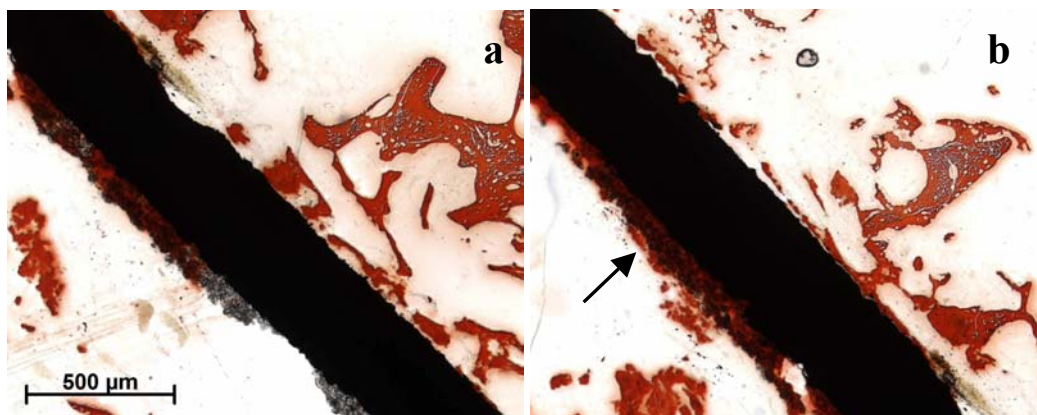


Abb. 25a und b: Verum von einem 7-Tagetier nach Alizarin S in 40facher Vergrößerung

Auch bei den 21-Tagetieren war die Kombination aus HA und BMP-2 dem unbeschichteten Implantat im Einwachsverhalten überlegen. Auf den ersten Blick fällt in Abb. 26 ein Unterschied zur jüngeren Gruppe nicht auf. Aber in der 21-Tagegruppe erkennt man die Bildung von Knochen auf der beschichteten Seite über größere Abschnitte des Implantats. In den Abb. 26d und e kann man sehen, dass der neugebildete Knochen zum Teil schon etwas dichter und weniger trabekulär geworden ist (Pfeil). Auf der unbeschichteten Seite hingegen ist auch nach drei Wochen weder eine knöcherne noch zelluläre Reaktion zu sehen.

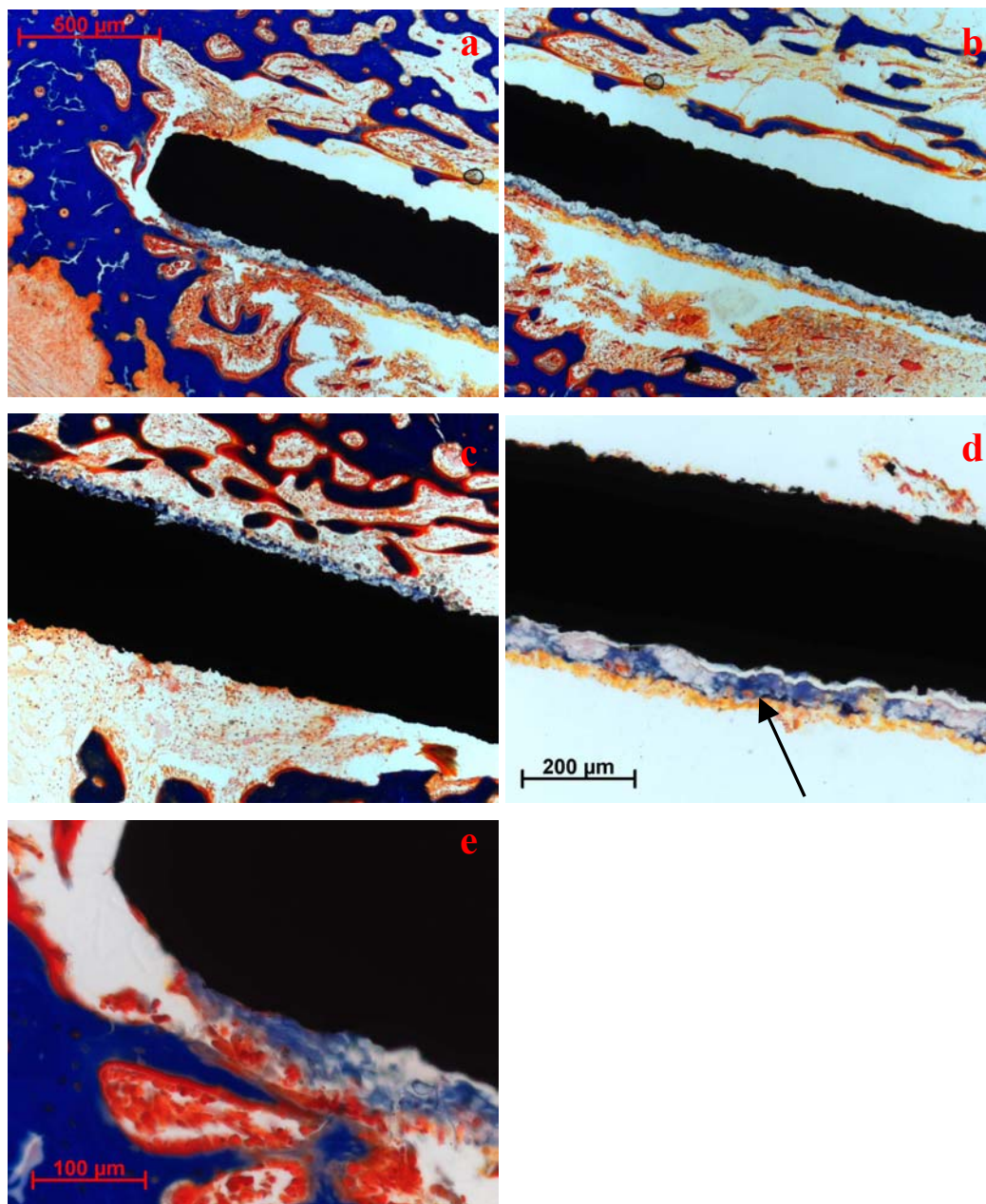


Abb. 26a-e: 21 Tage; a-d zeigen beide Implantatseiten im Vergleich in den Vergrößerungen 40 (a, b) und 80 (c, d); e zeigt die beschichtete Seite in 160facher Vergrößerung; Färbung nach Masson-Goldner

In den folgenden Bildern der 21-Tagegruppe ist nunmehr der einzige Fall dargestellt, bei welchem zu diesem Zeitpunkt Knochenwachstum auf der unbeschichteten Implantatseite zu beobachten war. In Abb. 27 ist sehr gut zu erkennen, wie dieser kompakte Knochen am Implantatreief anhaftet. Besonders die zarte Brücke in Abb. 27e spricht für eine spontane Knochenbildung (Pfeil). Ursache dieser Knochenbildung ist wahrscheinlich die große spontane Regenerationsfähigkeit der Kaninchen. Auch eine Fernwirkung des BMP-2 bis auf die unbeschichtete Seite lässt sich nicht ganz ausschließen.

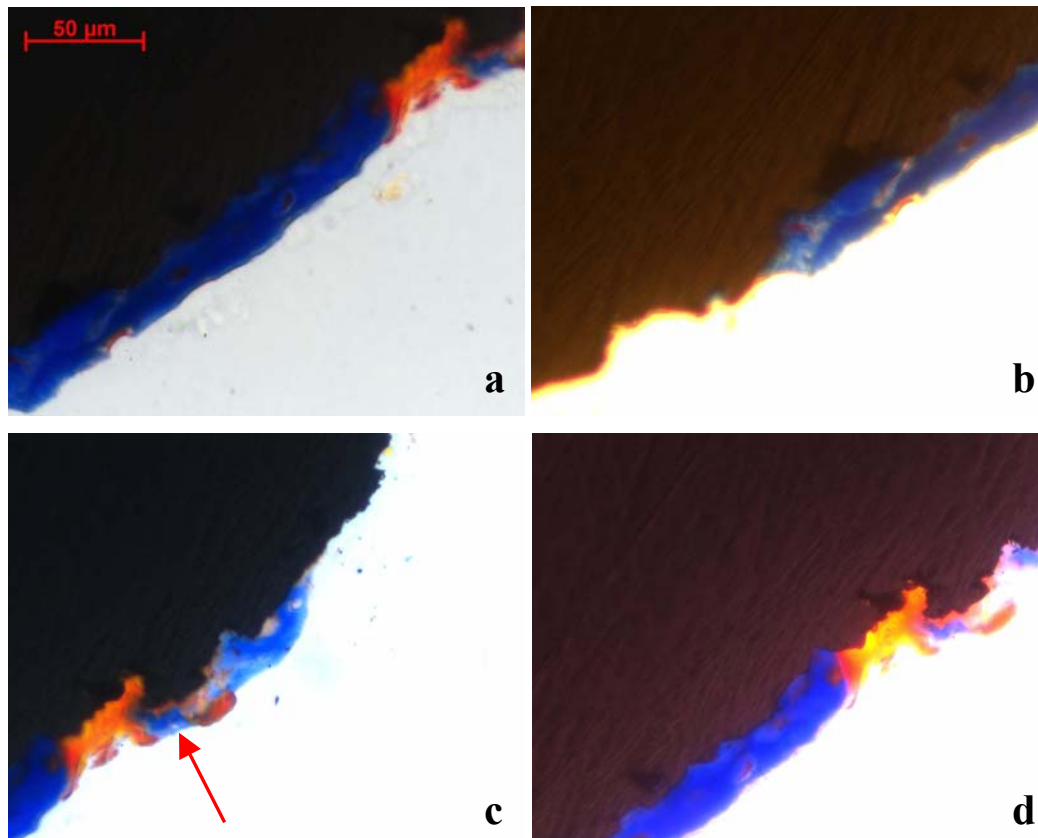


Abb. 27a-d: 21 Tage; unbeschichtete Seite mit anhaftendem Knochenstück; Färbung nach Masson-Goldner

In der 42-Tagegruppe ist der Unterschied zwischen beschichteter und unbeschichteter Seite nicht mehr so deutlich. Das Implantat wird jetzt von beiden Seiten ähnlich gut eingebaut. Das heißt, der Rückstand der unbeschichteten Seite wird aufgeholt. In Abb. 28 erkennt man einen größeren Unterschied zwischen beiden Seiten nur noch in Abb. 28d. Hier ist noch wie in den vorhergehenden Bildern die typische Knochenbildung direkt an der Oberfläche der beschichteten Seite zu sehen, welche auf der gegenüberliegenden Seite fehlt. Betrachtet man aber die anderen Bilder erkennt man beidseitig ein enormes Knochenwachstum. In diesem Fall besonders, aber nicht ausschließlich von der Kompakta ausgehend. Von hier sind Lamellen entstanden, die parallel zum Implantat ziehen und Kontakt zur Metalloberfläche aufnehmen. Auch wenn dieser Prozess mengenmäßig auf der beschichteten Seite etwas mehr erscheint, sind solche Knochenlamellen mit Implantatkontakt auch auf der unbeschichteten Seite vorhanden.

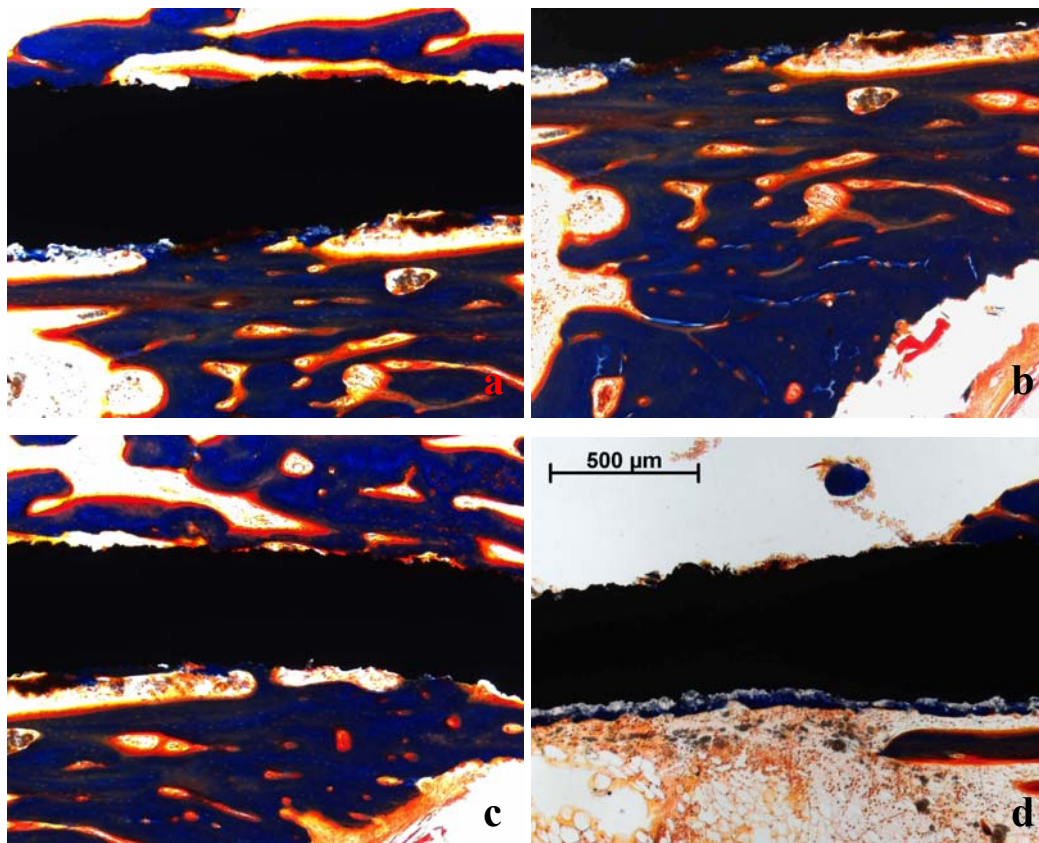


Abb. 28a-d: 42 Tage; verschiedene Bilder desselben Schliffes in 40facher Vergrößerung nach Masson-Goldner, wobei die beschichtete Seite immer unterhalb des Implantats ist

Die nachfolgenden Bilder unterstreichen noch einmal die oben gemachte Aussage. Von beiden Seiten wird hier (Abb. 29) das Implantat eingebaut. Auf der beschichteten Seite ist (alle Bilder vom gleichen Implantat) das HA noch gut erhalten. Darüber hat sich längs zum Implantat neuer Knochen gebildet. In Abb. 29a sieht man so eine Knochenlamelle auch auf der unbeschichteten Seite. Sie hat keinen Kontakt zum umliegenden, von der Kompakta ausgehenden Knochen, weshalb man annehmen könnte, dass dieser Knochen neu, das heißt spontan entstanden ist. In den anderen Bildern ist der auf der unbeschichteten Seite am Implantat anliegende Knochen sicher auch von der umgebenden Kompakta bzw. Spongiosa ausgegangen. Aber er richtet sich parallel zum Metallplättchen aus und führt ebenfalls zum Einwachsen des Implantats.

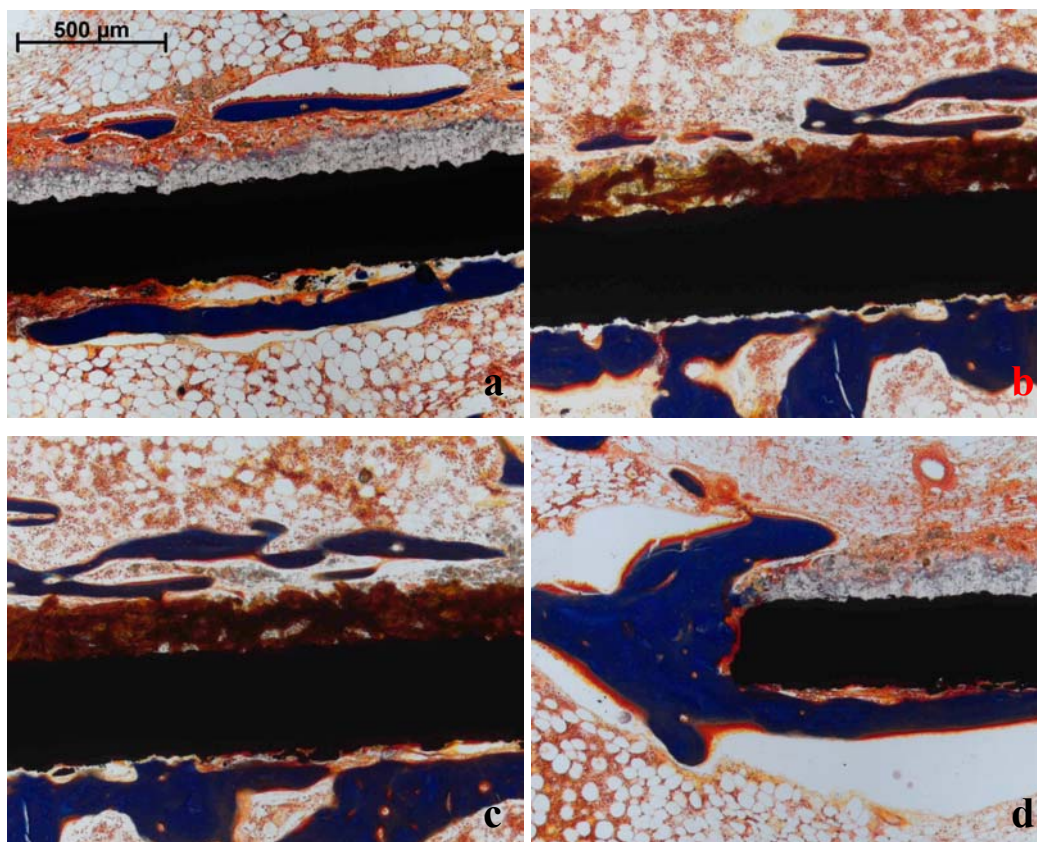


Abb. 29a-d: 42 Tage; verschiedene Bilder desselben Schliffes in 40facher Vergrößerung nach Masson-Goldner, wobei die beschichtete Seite immer oberhalb des Implantats ist

Dennoch sind auch in dieser Gruppe immer noch feine Unterschiede zwischen beiden Beschichtungen erkennbar. Auf der beschichteten Seite in Abb. 30b ist eine deutliche Verzahnung des Knochens mit der Metalloberfläche zu sehen, welche auf der Gegenseite fehlt. Dort löst sich der Knochen beim Fixierungsprozess leicht ab. Die vergrößerte Darstellung der unbeschichteten Seite in Abb. 30c zeigt, dass nach dem Ablösen nur noch eine azelluläre, fibrinähnliche Masse auf dem Implantat zurückbleibt.

Ein weiterer Unterschied fällt in der Übersicht in Abb. 30a auf. In der Umgebung der beschichteten Seite hat sich unter BMP-2-Einfluß vitales Knochenmark gebildet. Hingegen findet man auf der nicht beschichteten Seite nur fibröses Gewebe und Fettmark.

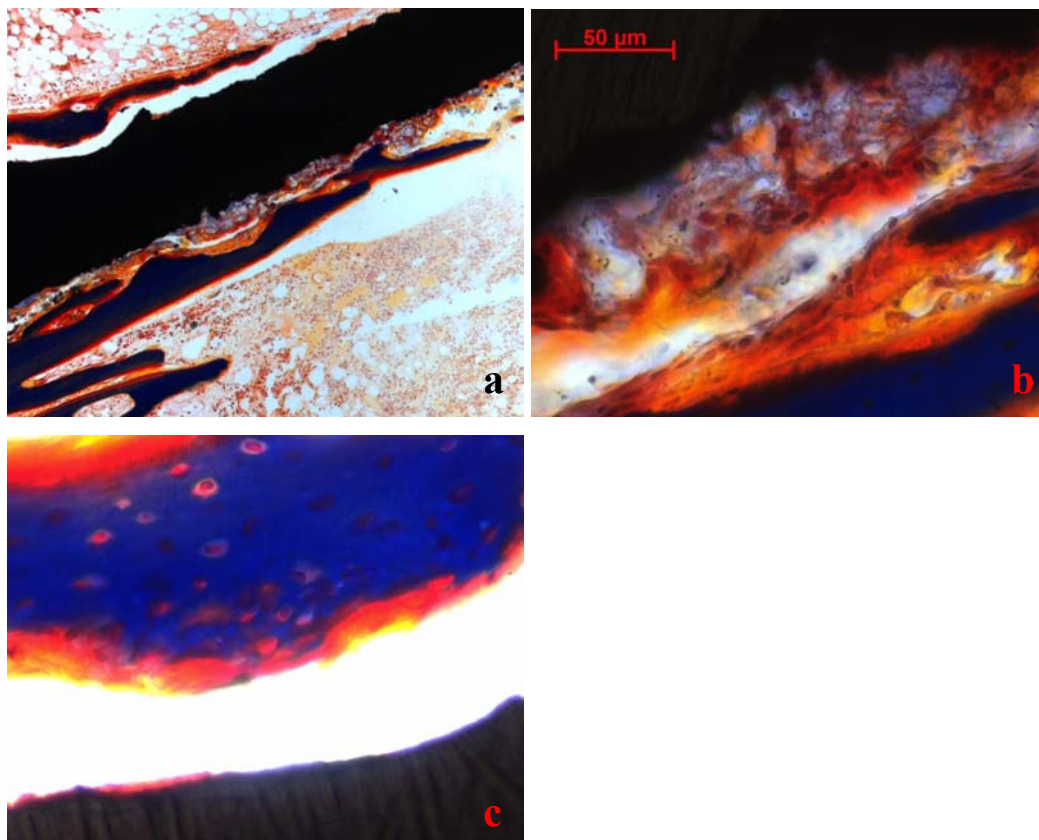


Abb. 30a-c: 42-Tagegruppe mit Übersicht (a) in 40facher Vergrößerung (beschichtete Seite unten); b zeigt die beschichtete und c die unbeschichtete Seite jeweils in 320facher Vergrößerung; Färbung nach Masson-Goldner

Nach 100 Tagen ist ein Unterschied zwischen beschichteter und unbeschichteter Seite anhand des Einwachsverhaltens praktisch nicht mehr zu erkennen. Nur mit Hilfe von noch vorhandenem HA, wie in Abb. 31c, ist eine Unterscheidung möglich. Betrachtet man die Bilder aus Abb. 31, sieht man, dass das Implantat von beiden Seiten gleichmäßig von Knochen umbaut wurde.

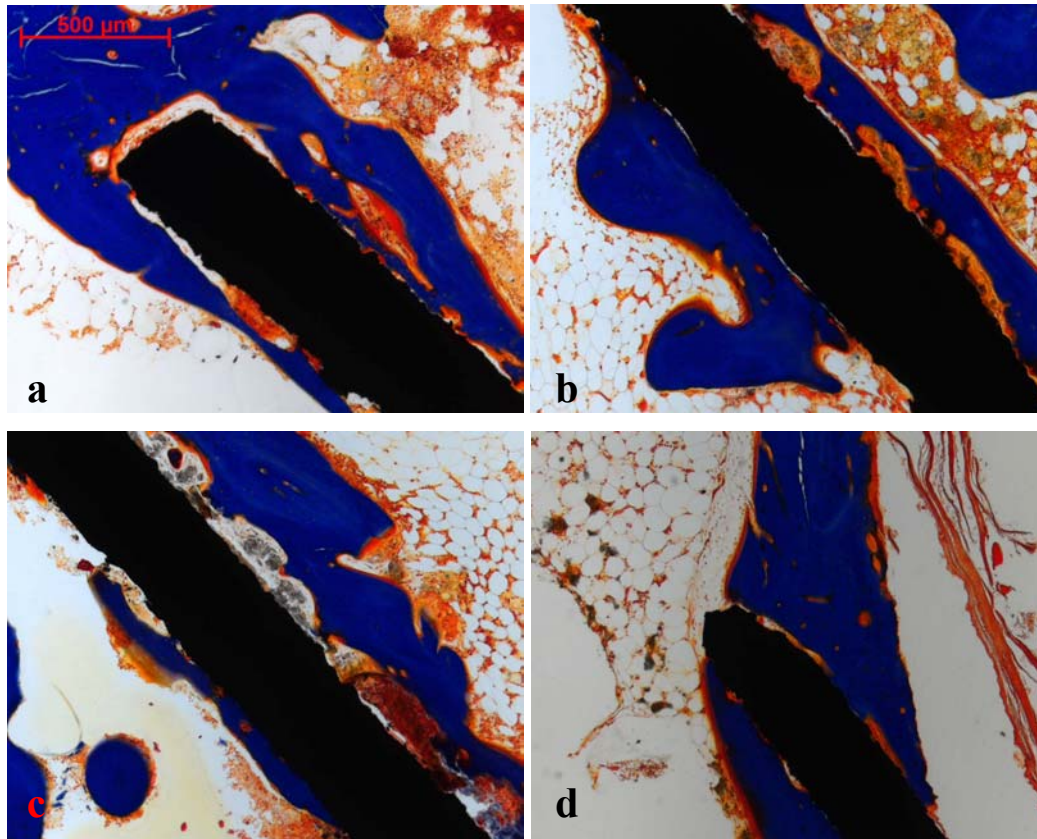


Abb. 31a-d: Schliffe der 100-Tagegruppe in 40facher Vergrößerung nach Masson-Goldner

Als diese Kaninchenversuchsgruppe abgeschlossen war, führten wir noch eine zweite Versuchsreihe durch. Dabei sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied im Einwachsverhalten von HA und BMP-2 beschichteten Implantaten gegenüber nur mit HA beschichteten gibt. Allerdings wurde hierzu nur eine 7-Tage- und eine 21-Tagegruppe gebildet, denn nach 42 Tagen gab es ja kaum noch einen Unterschied zwischen HA plus BMP-2 gegenüber der völlig unbeschichteten Implantathälfte. Die linksseitig eingebrachten Implantate wurden jetzt beidseitig mit HA und BMP-2 beschichtet. Die Kontrollen in den rechten Kaninchenbeinen waren beidseitig nur mit HA beschichtet.

In Abb. 32 erkennt man das übliche Bild einer HA und BMP-2-Behandlung, jetzt eben nur auf beiden Seiten des Metallplättchens.

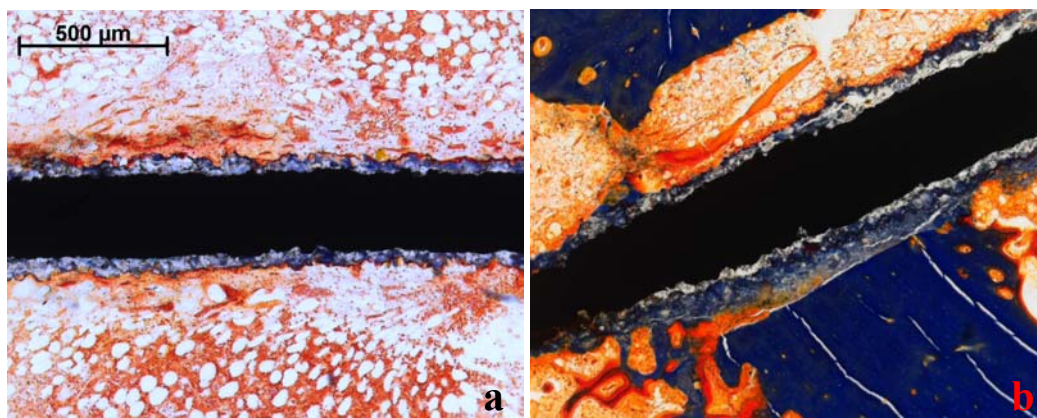


Abb. 32a und b: Die Implantate sind beidseitig mit HA und BMP-2 beschichtet. a) 7-Tagetier, Vergrößerung 5x8; b) 21-Tagetier, Vergrößerung 10x8; Färbung nach Masson-Goldner

Die folgenden Bilder zeigen Kontrollimplantate der rechten Seite, die auf beiden Seiten nur mit HA beschichtet sind. Vergleicht man diese mit den BMP-2 beschichteten, findet man hinsichtlich der Knochenneubildung keinen Unterschied. Schlussfolgernd könnte man sagen, dass beim jungen Kaninchen ein nur mit HA beschichtetes Implantat in den ersten 21 Tagen schneller einheilt als ein völlig unbeschichtetes. Eine zusätzliche BMP-2-Beschichtung bringt aber keinen weiteren Vorteil hinsichtlich Menge und Geschwindigkeit des Knochenwachstums.

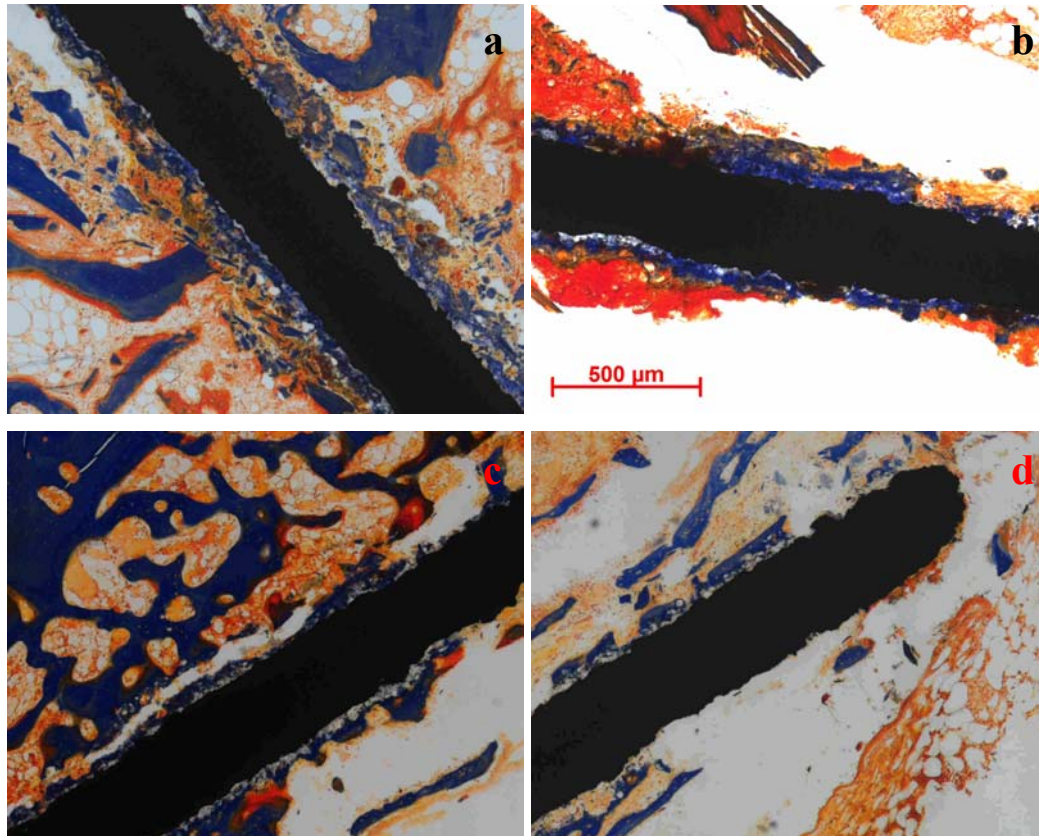


Abb. 33a-d: Alle Implantate sind beidseitig nur mit HA beschichtet. Die oberen zwei Bilder zeigen ein 7-Tagetier, die unteren ein 21-Tagetier. Vergrößerung bei allen 8x5. Färbung nach Masson-Goldner

7.2 Schafversuche

7.2.1 Makroskopische Ergebnisse

Die folgenden Abbildungen zeigen Fotos von Knochenblöcken und den dazugehörigen Implantaten nach dem Ausrissversuch. Es handelt sich hierbei um die Proben von 9-Wochentieren, bei denen der Zylinder vollständig entfernt wurde. Die Knochenblöcke wurden dann erst mittels Säge halbiert und vor dem Entkalken mit Alizarin-S gefärbt.

Abb. 34a-c zeigen immer dasselbe Zylinderpaar. Gut zu sehen ist, wie beim BMP-2-beschichteten linken Zylinder die zirkuläre Rinne vollständig mit hartem Material gefüllt ist (siehe Pfeil). Sogar eine längliche Vertiefung ist zugewachsen (siehe Pfeil). Beim rechten Implantat ist nur der halbe Ring mit weniger festem Material gefüllt (siehe Pfeil). In Abb. 34c zeigt der linke Zylinder nach Alizarin S-Gabe eine intensive Rotfärbung, was auf eine starke Knochenbildung hinweist. Beim Rechten ist die Rotfärbung weniger auffällig. Im letzten Bild sind die halbierten Blöcke nach dem Ausreißen plus Alizarin S dargestellt. Deutlich ist die intensivere Rotfärbung des linken Zylinderbettes zu erkennen.

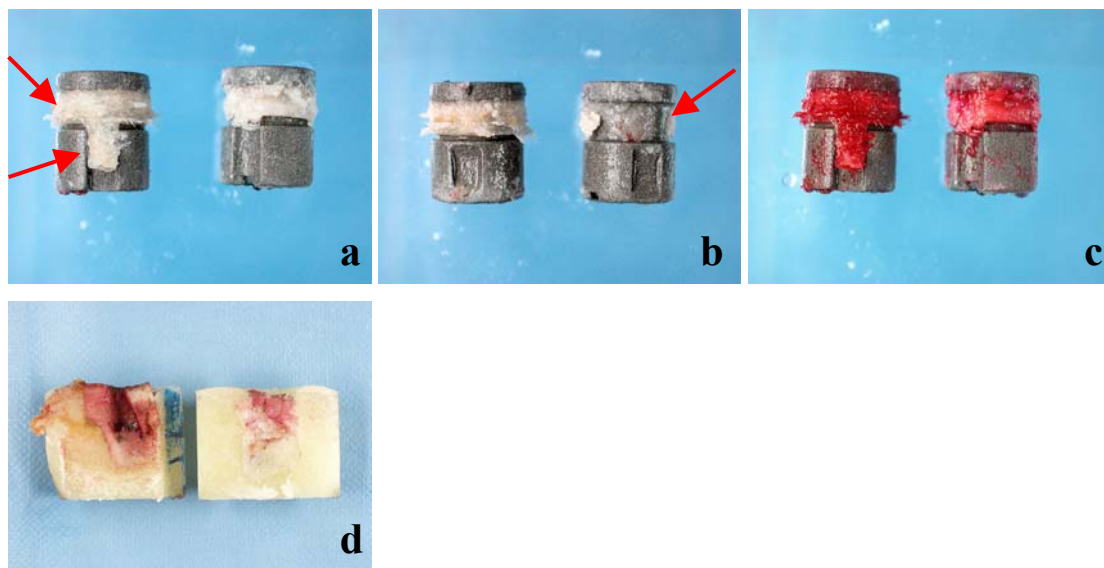


Abb. 34a-d: a) Zylinderpaar nach dem Ausriss; b) wie a, nur Rückseite; c) wie a plus Alizarin S; d) Zylinderbett nach dem Ausriss plus Alizarin S; Verum ist immer links, Placebo rechts

7.2.2 Radiologie

Die ersten Einheilungszeichen erschienen nach ca. 6 Wochen. Im mammographischen Röntgenbild fanden sich vor allem bei den mit BMP-2 behandelten Tieren 1-2 mm breite Zonen mit verstärkter Absorption um die implantierten Zylinder. Nach 20 Wochen war diese Zone noch dichter, also sklerosierter und häufig auch breiter geworden.

Die beiden postoperativen Bilder aus Abb. 35 (mit BMP-2) und 36 (ohne BMP-2), in denen natürlich noch keine röntgenologischen Unterschiede zu sehen sind, stellen den Ausgangszustand dar. Deutlich sind die Kanäle der Knochenfräse in der Kompakta zu sehen.

Nach 6 Wochen hat sich beim linken (BMP-2) Implantat eine deutliche, ca. 2mm dicke Zone verstärkter Absorption um den Zylinder gebildet. Deren Ausrichtung ist sowohl längs zum Zylinder als auch zirkulär. Die zirkuläre Ausrichtung erkennt man am im Markraum liegenden inneren Implantatende. Da nämlich der Zylinder in seiner Längsachse nicht ganz parallel zum Röntgenfilm lag, konnte diese Zone mit abgebildet werden. Das rechte (kein BMP-2) Implantat bleibt zu diesem Zeitpunkt in seiner Einheilung weit hinter dem linken zurück. Lediglich an der äußeren in der Kompakta liegenden Implantathälfte sind dünnere (höchstens 1mm) längs ausgerichtete Zonen geringer Absorption zu erkennen.

Nach 9 Wochen erscheinen die Absorptionszonen beim linken Zylinder noch dichter. Es liegt also eine vermehrte Slerosierung oder auch Mineralisierung des neugebildeten Knochens vor. Außerdem hat eine vermehrte Ausrichtung des Knochens stattgefunden. Von der Kompakta her ziehen zwei Knochenspanen zur zirkulären Nut und klemmen das Implantat wie eine Zange ein. Die oben beschriebene zirkuläre Zone ist in ihrer Breite allerdings etwas geringer geworden. Das heißt hier hat im Sinne eines aktiven Knochenumbauprozesses eine Resorption stattgefunden. Das rechte Implantat zeigt nach 9 Wochen gegenüber dem 6-Wochenbild wenig Veränderungen. Die nach 6 Wochen entstandenen Mineralisationszonen sind etwas dichter, aber kaum größer geworden.

Nach 20 Wochen sind beim linken Implantat die oben beschriebenen Beobachtungen weiter fortgeschritten. Dicht mineralisierte Knochenspanen verankern den Zylinder im Knochen. Auch innerhalb der Kompakta ist längs zum Implantat ausgerichteter Knochen zu finden, was besonders gut am äußeren Implantatteil distal zu sehen ist. Am inneren Implantatteil ist hingegen weiter Knochen, der wahrscheinlich zur Stabilisierung nicht mehr nötig ist, resorbiert worden. Beim 20-Wochenbild des rechten Zylinders hingegen sind die Beobachtungen des Vorbildes nur wenig fortgeschritten.

Beim Feinröntgen des entnommenen zugesägten linken Implantats bestätigten sich die bisherigen Ergebnisse. In der Längsabbildung (Strahlengang hier senkrecht zur Knochenlängsachse) sind wiederum Knochenspangen, die bis zur zirkulären Nut reichen, gut zu erkennen. Das bedeutet der Zylinder wird an seiner Mantelfläche fest durch Knochen verankert. Am inneren Implantatende ist hingegen auch hier weniger Absorption vorhanden. In der zirkulären Abbildung findet man einen fast vollständigen mineralisierten Ring um den Zylinder, der zum Teil 3mm stark ist. Wobei die Ausrichtung des Knochens hier vor allem zirkulär erscheint. Auch beim rechten Zylinder ist in der Längsabbildung eine Knochenspanne (rechts im Bild) zu sehen. Allerdings ist sie weitaus weniger mineralisiert als beim linken Zylinder. Auch insgesamt gesehen ist rechts die Strahlenabsorption um das Implantat herum weniger als links. Im zirkulären Bild wird dies ebenfalls deutlich. Dort ist zwar ein fast geschlossener Ring zu finden. Dieser ist aber an den meisten Stellen dünner und die Mineralisation viel geringer als beim linken Zylinder.

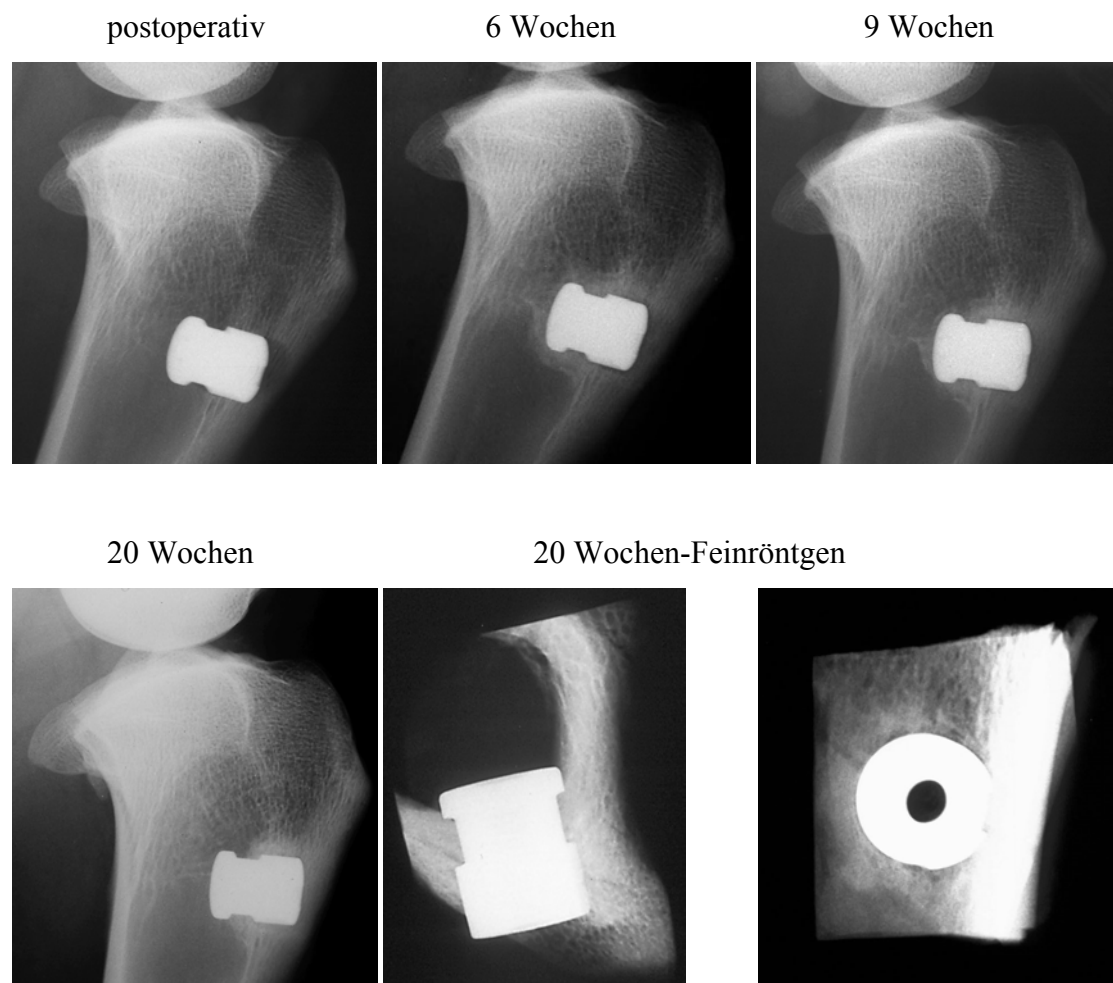


Abb. 35: Röntgenverlaufskontrollen des linken Zylinders (mit BMP-2) eines 20-Wochentieres

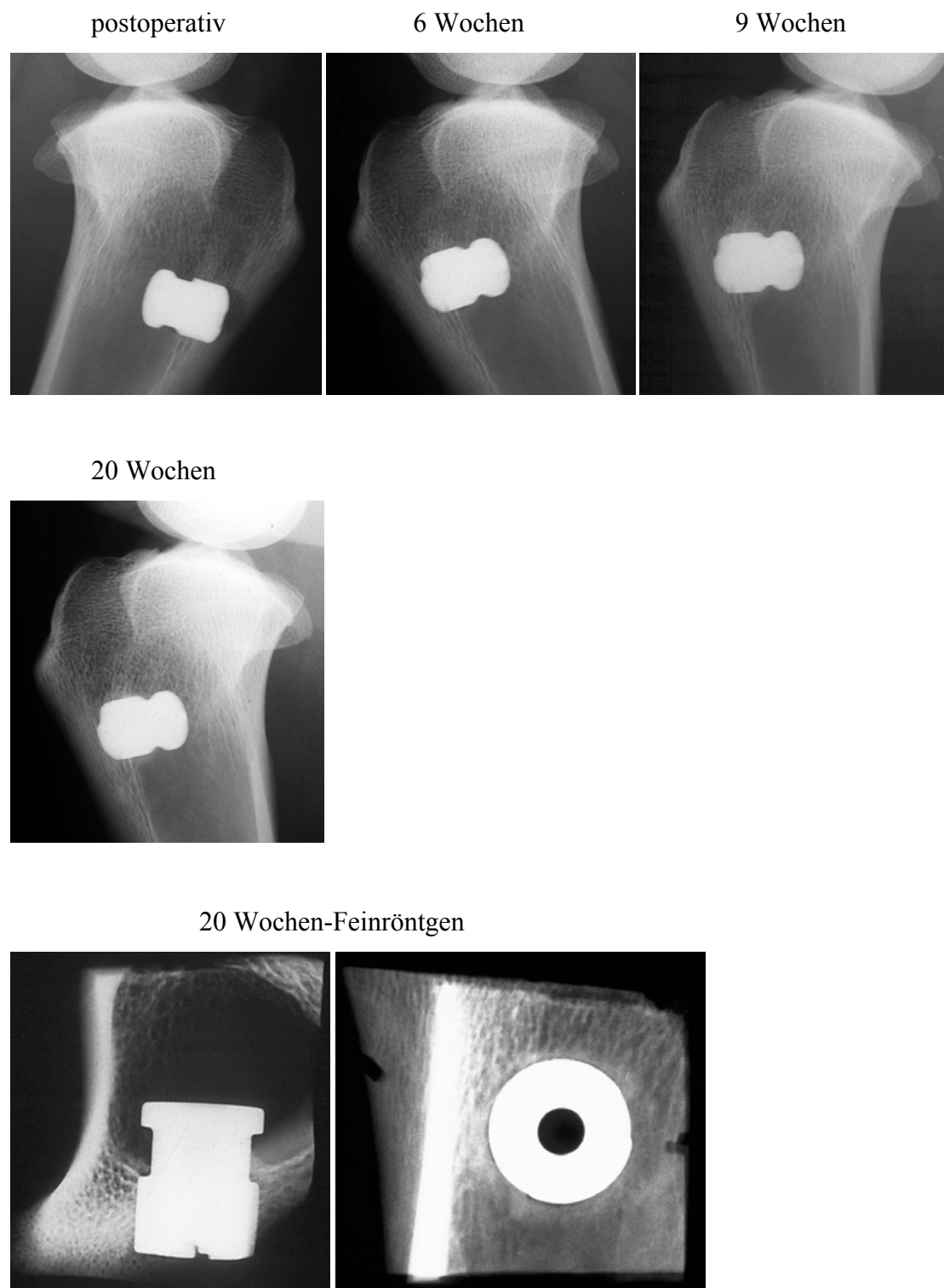


Abb. 36: Röntgenverlaufskontrollen des rechten Zylinders (ohne BMP-2) eines 20-Wochentieres

7.2.3 Histologie

7.2.3.1 Konventionelle Histologie

Nach 9 Wochen konnte man auch in der histologischen Auswertung entscheidende Unterschiede zwischen beschichteter und unbeschichteter Seite erkennen. Die fotografierten Schnitte des Implantatbetts geben einen guten Vergleich zwischen linker und rechter Seite. Die jeweils nebeneinanderliegenden Bilder aus Abb. 37 sind Verum und Placebo vom selben Tier. In den rechten Bildern (ohne BMP-2) ist fast nur vorbestehende Kompakta Spongiosa und viel Fettmark zu finden. Die Schnitte der BMP-2 beschichteten Zylinder zeigen im Gegensatz dazu eine enorme Knochenneubildung. Um die Linie des früheren Implantats verlaufen kleine zarte Knochenbälkchen meist parallel zum Zylinder. Natürlich ist auch in diesen Schnitten alter Knochen zu finden, denn die Zylinder waren ja nicht vollständig von Fettmark umgeben. Aber zu diesem vorhandenen Knochen hat sich neuer nachgebildet. Besonders gut ist dies in Abb. 37c zu sehen. Hier erkennt man ganz links im Bild die alte Spongiosa und daran Richtung Implantat ansetzend die neuen viel zarteren Knochenbälkchen. Bedeutend ist außerdem, dass in den linken Bildern kein oder kaum Fettmark um den Zylinder herum vorhanden ist wie auf der rechten Seite. Anstelle dessen wird dieser Raum durch feine Knochentrabekel ausgefüllt. Das heißt, das BMP-2 hat im Fettmark die Bildung von neuem Knochen induziert. Diese Knocheninduktion konnte im Fettmark bei den nur mit HA beschichteten Implantaten so gut wie nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 37b und d).

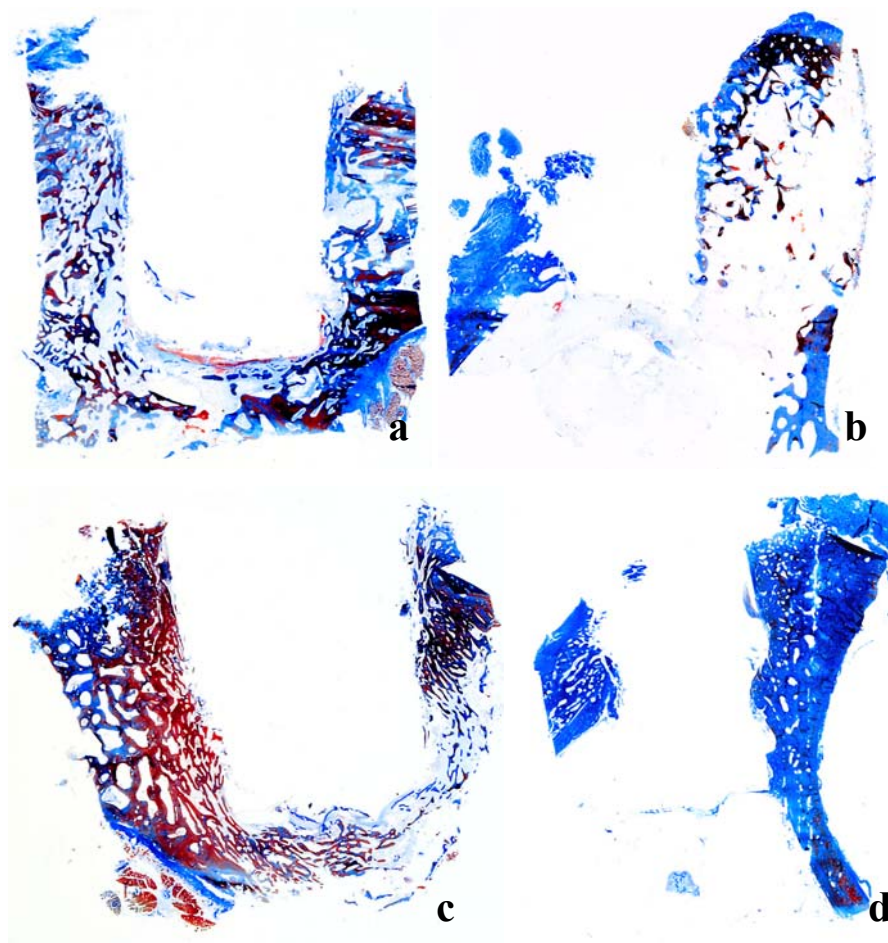


Abb. 37a-d: Fotografierte Längsschnitte des Implantatbetts von 9 Wochen alten Schafen nach Masson-Goldner, wobei links die BMP-2 beschichteten Zylinder und daneben die zugehörigen Kontrollen sind

Die folgenden Bilder aus Abb. 38 sind Ausschnitte der schon gezeigten oder anderer Übersichten. Sie unterstreichen zusätzlich die oben genannten Beobachtungen. Alle diese Bilder stammen von Zylindern mit BMP-2. Abb. 38a und b sind Ausschnitte vom Mantelbereich. Hier sind die neu ausgebildeten Trabekel entlang des Implantates gut zu erkennen. Abb. 38c ist ein Ausschnitt des Zylinders aus dem Übergang von Mantel zum Boden. Hier befindet man sich schon mehr im Markraum, in dem kein alter Knochen mehr als Leitstruktur vorhanden ist. Dennoch sind die Trabekel ebenfalls sehr schön ausgebildet, obwohl die BMP-2-Menge natürlich beim Übergang vom Mantel zum Boden geringer wird, da der Zylinderboden ja nicht beschichtet war. Interessant an diesem Bild ist auch das zwischen den Knochenbälkchen befindliche Gewebe. Zu Versuchsbeginn handelte es sich hierbei wahrscheinlich um Fettmark. Jetzt ähnelt es mehr einer Art retikulären Bindegewebe, welches sich wohl vor der Knochenbildung durch BMP-2-Wirkung aus dem Fettgewebe gebildet hat. Die restlichen drei Bilder stammen vom Bodenbereich des Knochenbettes. Hierher kann BMP-2 nur durch Lösen vom Zylinder beim Einsetzen oder durch Ausbreitung dorthin gelangen. Auch eine Fernwirkung des BMP-2 über diese Strecke kann man nicht ausschließen. Jedenfalls ist auch in diesen Bildern durch die Entstehung von Knocheninseln und retikulärem Gewebe eine Wirkung des Wachstumsfaktors zu erkennen.

Die im linken Bildbereich von Abb. 38d und f braun (Pfeil 1) bzw. blau (Pfeil 2)gefärbten Anteile sind sicher noch kein fertiger Knochen, sondern vielmehr als eine Vorstufe zu verstehen, die aus dem retikulären Gewebe entstanden ist.

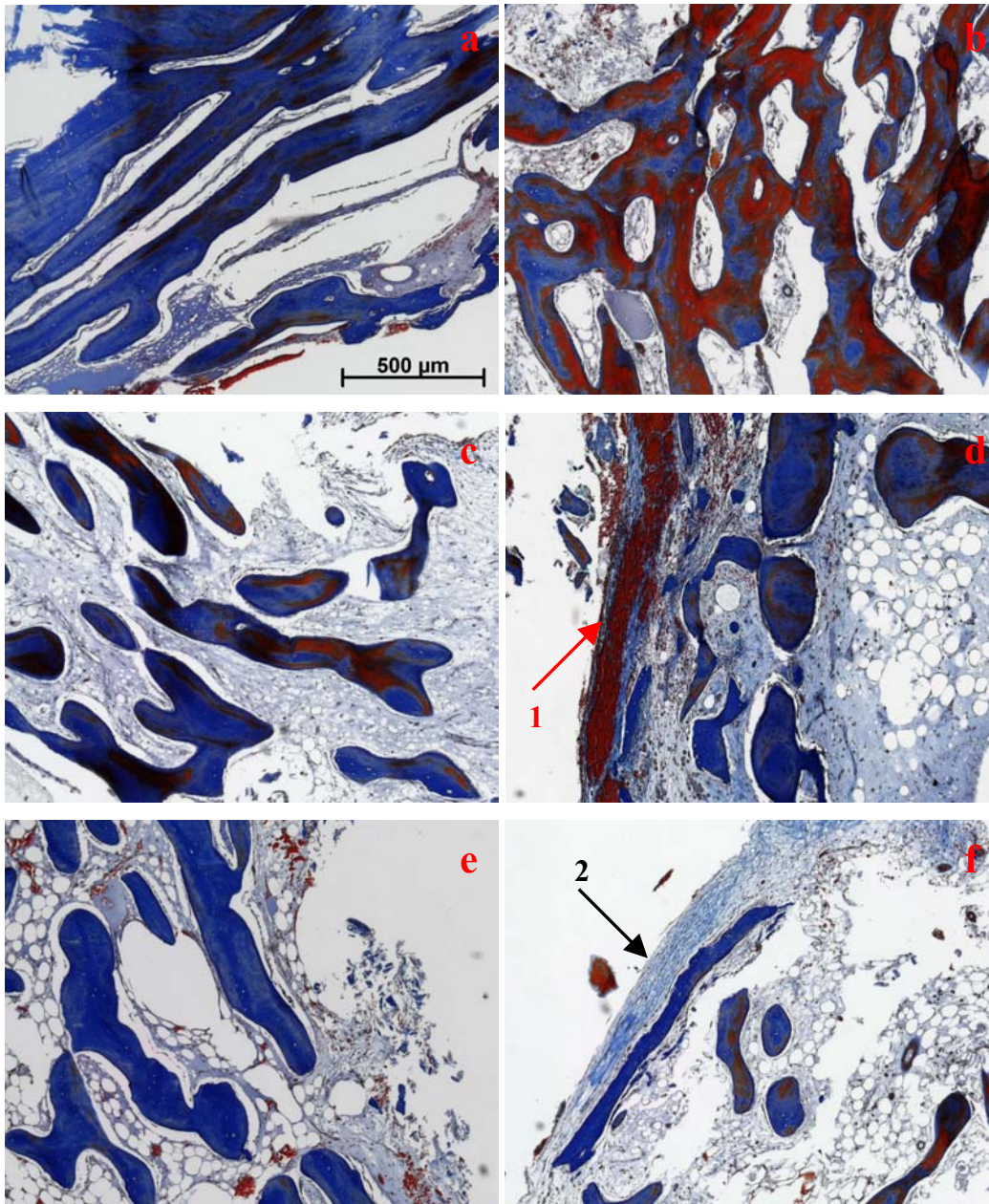


Abb. 38a-f: Bilder von 9-Wochentieren mit BMP-2 in 40facher Vergrößerung

Die folgende Abbildung bietet Bilder von linken (BMP-2-beschichteten) Zylindern in stärkeren Vergrößerungen. Sie zeigen eine hohe Dichte knochenpotenter Zellen und ein hohes Maß an Aktivität solcher Zellen. Zum einen finden sich Osteoblasten - besonders in den Abb. 39b, c und d in großer Menge entlang der Knochenbälkchen (Pfeil 2 und 3) - und zum anderen Osteoklasten, z. B. in Abb. 39e und f (Pfeil 4, 5 und 6). Insbesondere die ersten beiden Bilder dieser Abbildung zeigen Zellen, die optisch Chondrozyten ähneln (Pfeil 1). Jedoch konnte durch die Safranin-O-Färbung nachgewiesen werden, dass es sich

nicht um Knorpelzellen handelte. Die Knochenneubildung erfolgte demnach also nicht enchondral, sondern desmal aus dem retikulären Bindegewebe heraus.

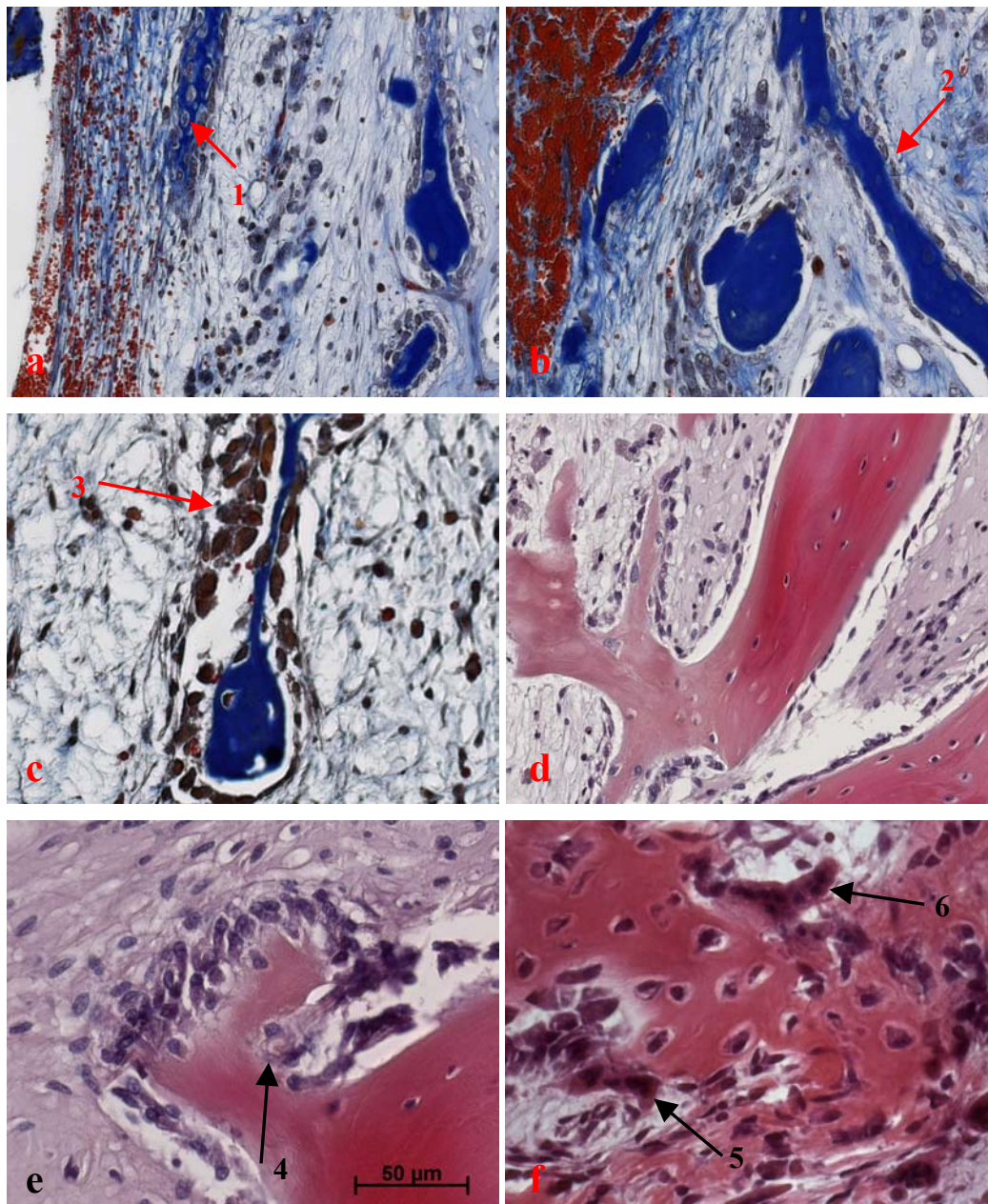


Abb. 39a-f: Alle Schnitte stammen von BMP-2-Zylindern von 9-Wochentieren. a-c sind nach Masson-Goldner gefärbt und d-f nach HE. a, b und d in 20x8; c, e und f in 40x8

Detailaufnahmen des Knochenbetts des rechten Zylinders bestätigen, dass dieser in seiner Einheilung hinter dem linken zurücklag. In erster Linie erfolgte ein konduktives Einwachsen von der Kompakta her, wie die ersten beiden Bilder aus Abb. 40 zeigen. Es waren auch neugebildete Trabekel, zum Teil auch im Fettmark zu beobachten (siehe Abb. 40c, d und e). Die Menge dieses Knochenwachstums war aber weitaus weniger, als auf der

linken Seite und man kann somit nur von einzelnen Befunden sprechen. Auffallend war hingegen das Vorhandensein von viel unverändertem Fettmark und das weitgehende Fehlen von osteopotenten Zellen (siehe Abb. 40e und f).

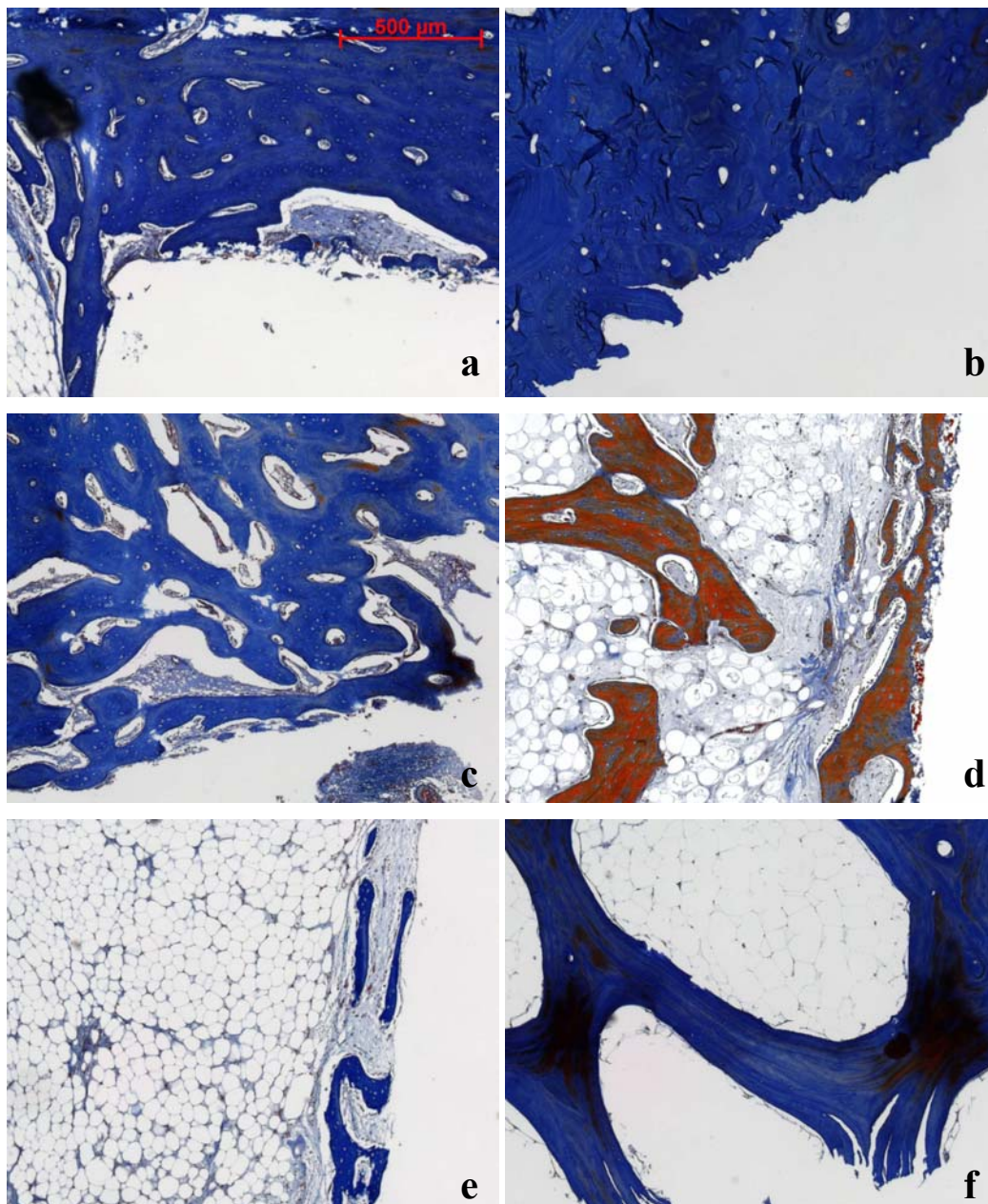


Abb. 40a-f: Alle Schnitte stammen von Nicht-BMP-2-Zylindern von 9-Wochentieren und sind nach Masson-Goldner gefärbt; Vergrößerung 40

Von den beim Ausziehversuch vollständig herausgezogenen Zylindern konnten die Knochenringe aus der zirkulären Vertiefung ebenfalls histologisch aufgearbeitet werden und links mit rechts verglichen werden (siehe Abb. 41). Drei von vier der nach dieser Methode ausgezogenen Zylinder hatten links auch histologisch einen fast geschlossenen

Knochenring, wie in den Übersichten zu sehen ist. Die dazugehörigen Placebos konnten maximal einen halben Ring aufweisen und beim Zylinder aus Abb. 41f war kaum verarbeitbares Material zu isolieren.

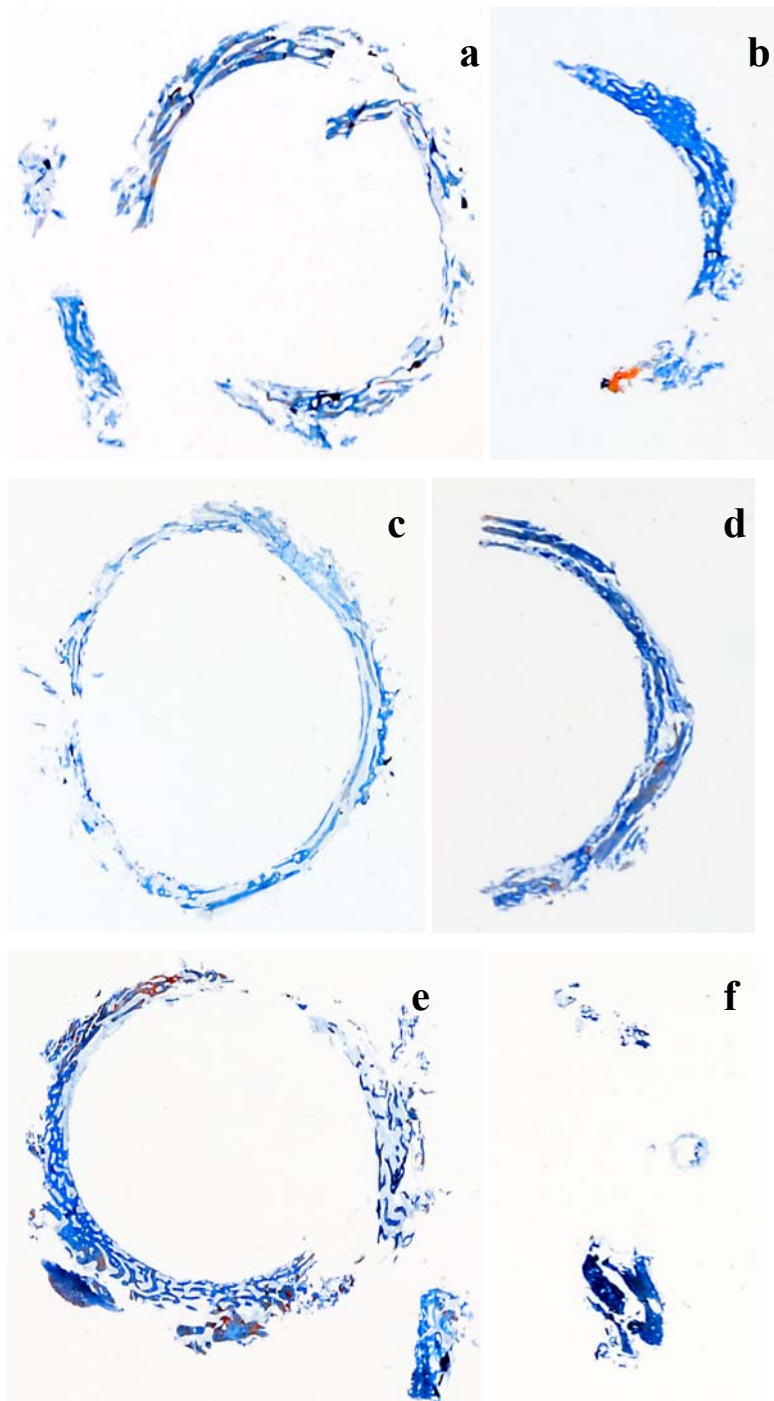


Abb. 41a-f: Übersichten der Knochenringe aus zirkulärer Zylindernut von 9-Wochentieren , wobei links das Verum und rechts das Placebo ist; Färbung nach Masson-Goldner

Die nächsten Bilder aus Abb. 42 zeigen in stärkerer Vergrößerung die Knochenringe der linken Implantate. Schön zu sehen sind zarte Knochenlamellen, wie in Abb. 42b und c oder auch schon dichter Knochen, wie in 42a und d. Die zirkuläre Vertiefung war 1mm tief und zum Implantationszeitpunkt natürlich noch nicht von Knochen gefüllt. Dieser eine Millimeter ist also nach 9 Wochen im ganzen Umfang des Zylinders von Knochen überbrückt worden.

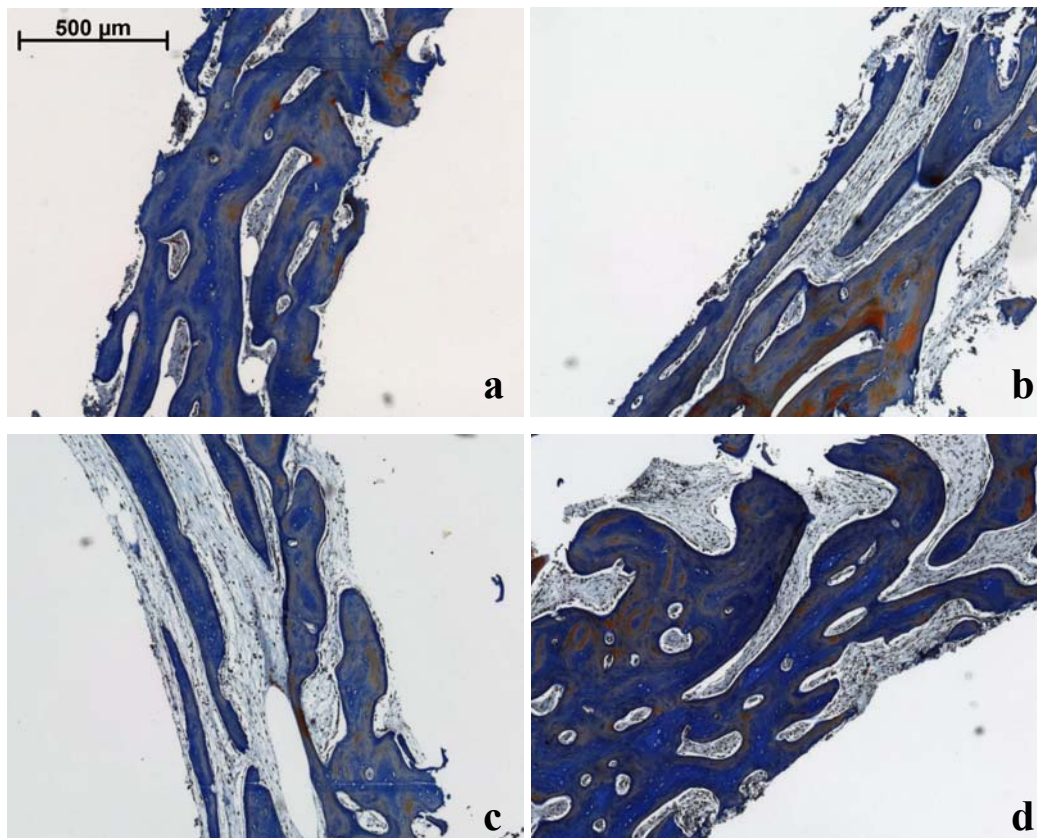


Abb. 42a-d: Schnitte von Zylinderringen von 9-Wochentieren unter BMP-2-Wirkung in 40facher Vergrößerung (nach Masson-Goldner)

Die anschließenden Bilder verdeutlichen, dass auch in diesem Bereich die zelluläre Aktivität hoch ist. Abb. 43a zeigt die bekannten Osteoblasten und Abb. 43b Chondrozyten ähnelnde Zellen (Pfeil in 43b). In allen Bildern dieser Abbildung findet man wieder retikuläres Bindegewebe mit Fibroblasten und speziell Abb. 43c verdeutlicht noch mal die Knochenbildung direkt aus diesem Bindegewebe (Pfeile in 43c).

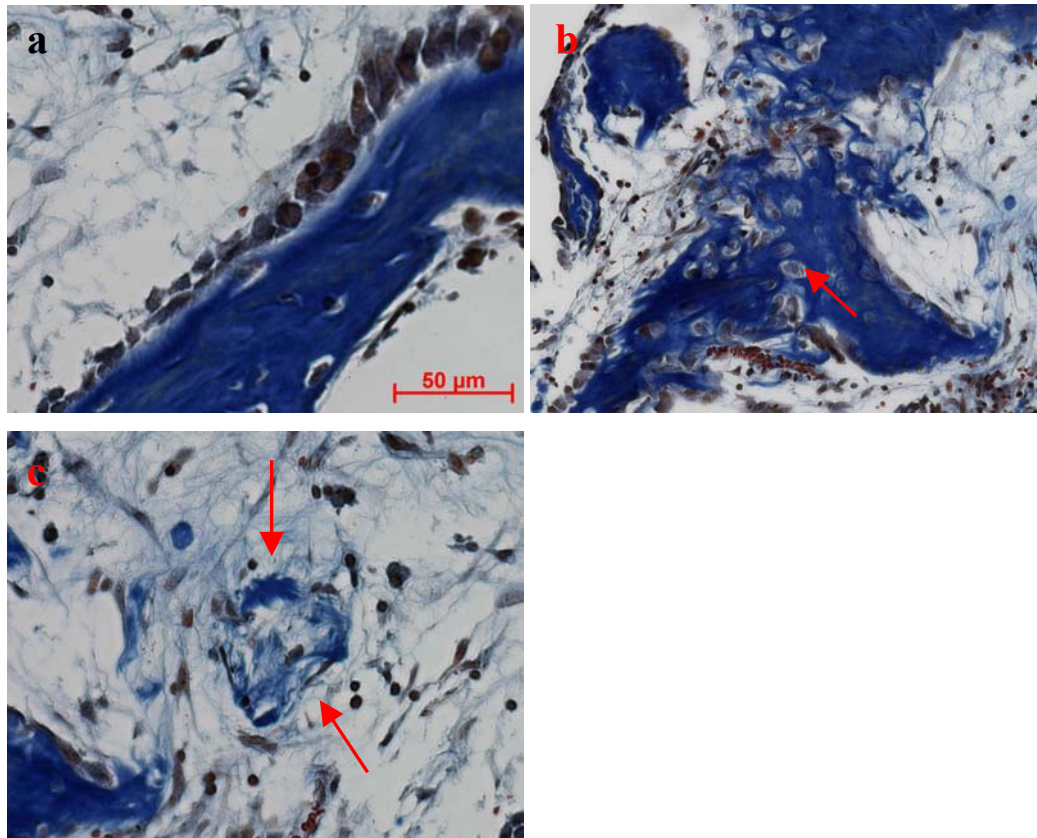


Abb. 43a-c: Schnitte von Zylinderringen von 9-Wochtieren unter BMP-2-Wirkung (nach Masson-Goldner); a und c in 320facher Vergrößerung, b in 160facher Vergrößerung

Auch am rechten Zylinder wurde in der zirkulären Rinne Knochen angebaut, wie Abb. 44 zeigt. Ebenso sind Osteoblasten zu finden (Abb. 44b). Aber die Menge des neuen Knochens war weitaus geringer (siehe auch Übersichten in Abb. 41), genauso wie die Anzahl knochenmodulierender Zellen. Des weiteren war auch das schon genannte retikuläre Bindegewebe auf der rechten Seite nicht anzutreffen.

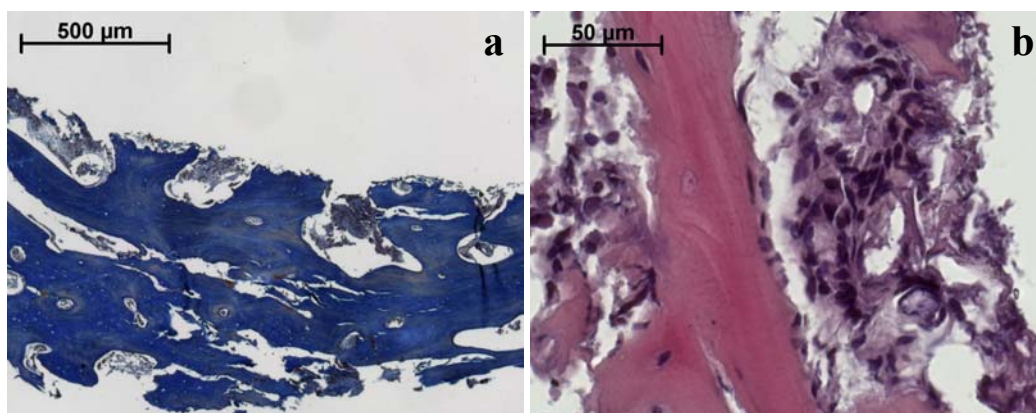


Abb. 44a und b: Schnitte von Zylinderringen von 9-Wochtieren ohne BMP-2 nach Masson-Goldner (a) und HE (b); a in 40facher und b in 320facher Vergrößerung

Nach 20 Wochen änderte sich das histologische Bild. Bisher war das Knochenwachstum der linken Seite vor allem durch eine starke Neubildung von meist zartem trabekulären Knochen geprägt. Jetzt kommt es mehr zu einer stabilen Ausrichtung und Umbau des Knochens mit teilweiser Resorption. Rechts findet man ähnliche Prozesse, aber weniger intensiv ausgeprägt.

In Abb. 45 erkennt man gut die oben genannten Merkmale. Das Knochenbett des linken Zylinders zeigt zu beiden Seiten längs ausgerichtete Knochenlamellen, die zum Teil trabekulär (rechte Seite im Bild) oder auch kompakt (linke Seite im Bild) organisiert sind. Entscheidend ist, dass diese Lamellen untereinander und mit der anschließenden Kompakta fest verbunden sind. Rechts zeigt die Kompakta in Abb.45a hinter den Längstrabekeln eine deutliche Verbreiterung in Richtung Markraum. Aber auch nach oben (außen) ist ein trabekulärer Anbau zu erkennen. Links finden sich solche Anbauten ebenfalls. Besonders der untere reicht bis in die zirkuläre Nut und füllt diese aus (dies ist ein Anteil der im Röntgenbild beschriebenen Knochenspange). Weiter tiefer findet sich kein Knochen mehr, was entweder auf eine Resorption hinweist oder darauf, dass in dieser Schnittebene kein Knochen vorhanden war.

Dieses adaptive Knochenwachstum lässt sich beim Knochenbett des rechten Zylinders nicht vorfinden. Die Kompakta der linken Seite in Abb. 45b zeigt eine geringe Verbreiterung mit kleiner Ausziehung zur Zirkulärnut. Aber ohne eine so deutliche Längsorientierung, wie in Abb. 45a. Die rechte Seite zeigt zwar einen Knochenanbau entlang des ehemaligen Zylinders, doch auch in diesem fehlt die parallele Organisation und Ausrichtung zur Zylinderachse. Die dünne Kompakta dieser Seite und die spärlichen Trabekel zeigen ebenfalls keine Verstärkung bzw. Ausrichtung im Sinne einer Adaptation.

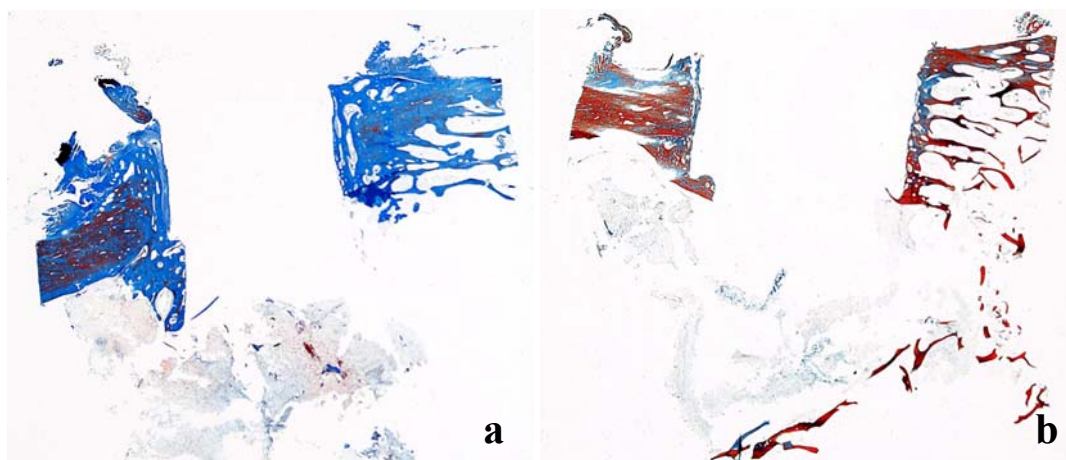


Abb. 45a und b: Längsübersicht eines 20-Wochentieres nach Masson-Goldner; Verum links, Placebo rechts

Auch in der Übersicht des Querschnitts in Abb. 46 sind Unterschiede gegenüber den 9-Wochentieren zu sehen. Besonders beim Knochenbett des linken Zylinders (Abb. 46a) zeigt sich eine adaptive Knochenausrichtung. Man erkennt diesmal zirkulär angelegte Knochenlamellen, die wiederum trabekulär oder kompakt organisiert und untereinander sowie mit ihrer Umgebung fest verbunden sind. Die drei Längsvertiefungen des Zylinders sind ebenfalls gut mit adaptiv gewachsenem Knochen ausgefüllt (Pfeile).

Im Knochenbett des rechten Zylinders wurde dieser Zustand der Adaptation nicht erreicht. Zirkulär ausgerichteten Knochen erkennt man nur im oberen Bildbereich in der Kompakta und im unteren Bildbereich. Doch dieser zirkuläre Knochen ist kaum bis gar nicht in den dahinter anschließenden Knochen integriert. Insbesondere die Spongiosa zeigt kaum Veränderungen. Auch das Relief der Zylinderlängsrillen ist nicht so deutlich abzugrenzen wie beim linken Implantat.

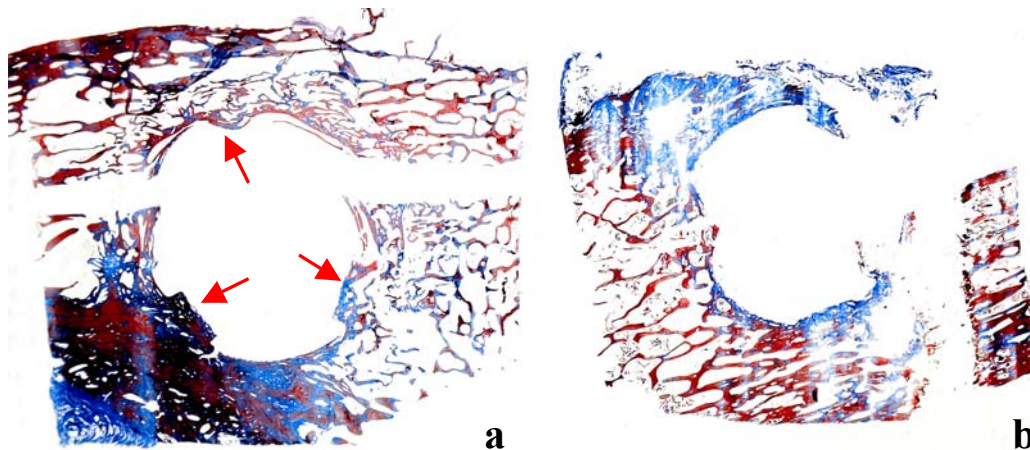


Abb. 46a und b: Querübersicht eines 20-Wochentieres nach Masson-Goldner; Verum links, Placebo rechts

Die folgenden Bilder zeigen vergrößerte Ausschnitte von BMP-2-beschichteten Zylindern. Zum einen sind Knochentrabekel zu erkennen (Abb. 47a, b, f), die gegenüber den 9-Wochentieren verstärkt miteinander verbunden und in die Umgebung integriert erscheinen (siehe dazu auch Übersicht in Abb. 45a). Zum anderen sieht man die längliche Orientierung des Knochens parallel zur Zylinderlängsachse. Unter dieser Orientierung ist zum einem das parallele Wachstum der Trabekel zu dieser Achse zu verstehen und zum anderen die ebensolche Ausrichtung der einzelnen Osteozyten und der Knochengrundsubstanz. Besonders gut sichtbar wird dies in den Abb. 47c und d. Selbst im kompakten Knochen ist hier in Implantatnähe diese Art der Ausrichtung vorzufinden. Wie oben schon beschrieben

ist es also zu einer Umorientierung des neuen Knochens im Sinne einer Adaptation gekommen.

Die letzten beiden Bilder dieser Abbildung zeigen Ausschnitte des Bereiches der zirkulären Nut. In diesem Raum ist stabil erscheinender Knochen eingewachsen, der gut mit dem außen anliegenden Knochen verbunden ist.

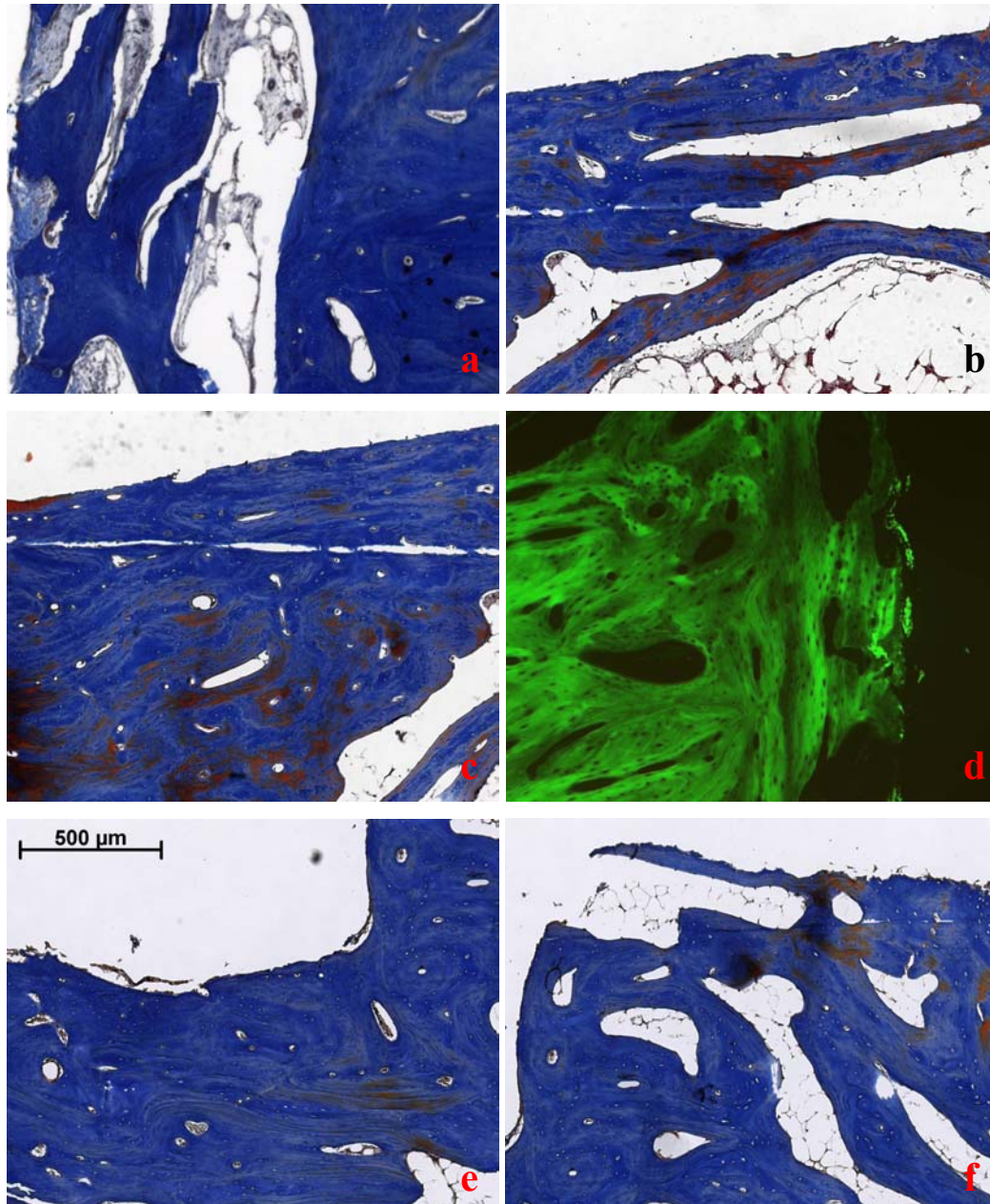


Abb. 47a-f: Bilder des Zylinderbettes von 20-Wochentieren mit BMP-2 in 40facher Vergrößerung; d ist mit Fluoreszenzlicht zur besseren Darstellung der Knochenausrichtung aufgenommen; Färbung nach Masson-Goldner

Durch vergrößerte Darstellungen von Schnitten der rechten Seite bestätigen sich ebenfalls die oben über Abb. 45b gemachten Aussagen. Die ersten vier Bilder aus Abb. 48 zeigen Knochen, der direkt am Zylinder anlag. Eine Ausrichtung und Orientierung des Knochens in dem Maße wie auf der linken Seite ist hier aber nicht zu finden. In Abb. 48a erkennt man noch am besten eine beginnende Adaptation des implantatnahen Knochens. Aber dennoch nicht so ausgeprägt, wie unter BMP-2-Einfluß.

In den letzten beiden Bildern sieht man Knochen, der in die zirkuläre Vertiefung des Zylinders vorwächst. In Abb. 48e wird diese sogar vollständig von Knochen ausgefüllt, der auch recht gut organisiert erscheint.

Auf Grund dieser Bilder muss man sagen, dass aus histologischer Sicht die rechte Seite im Einheilungsprozess aufgeholt hat. Ermöglicht wurde dies vor allem durch konduktives Knochenwachstum und teilweiser Organisation dieses Knochens. Die Adaptation und Organisation des neugebildeten Knochens der linken Seite wird allerdings nicht erreicht.

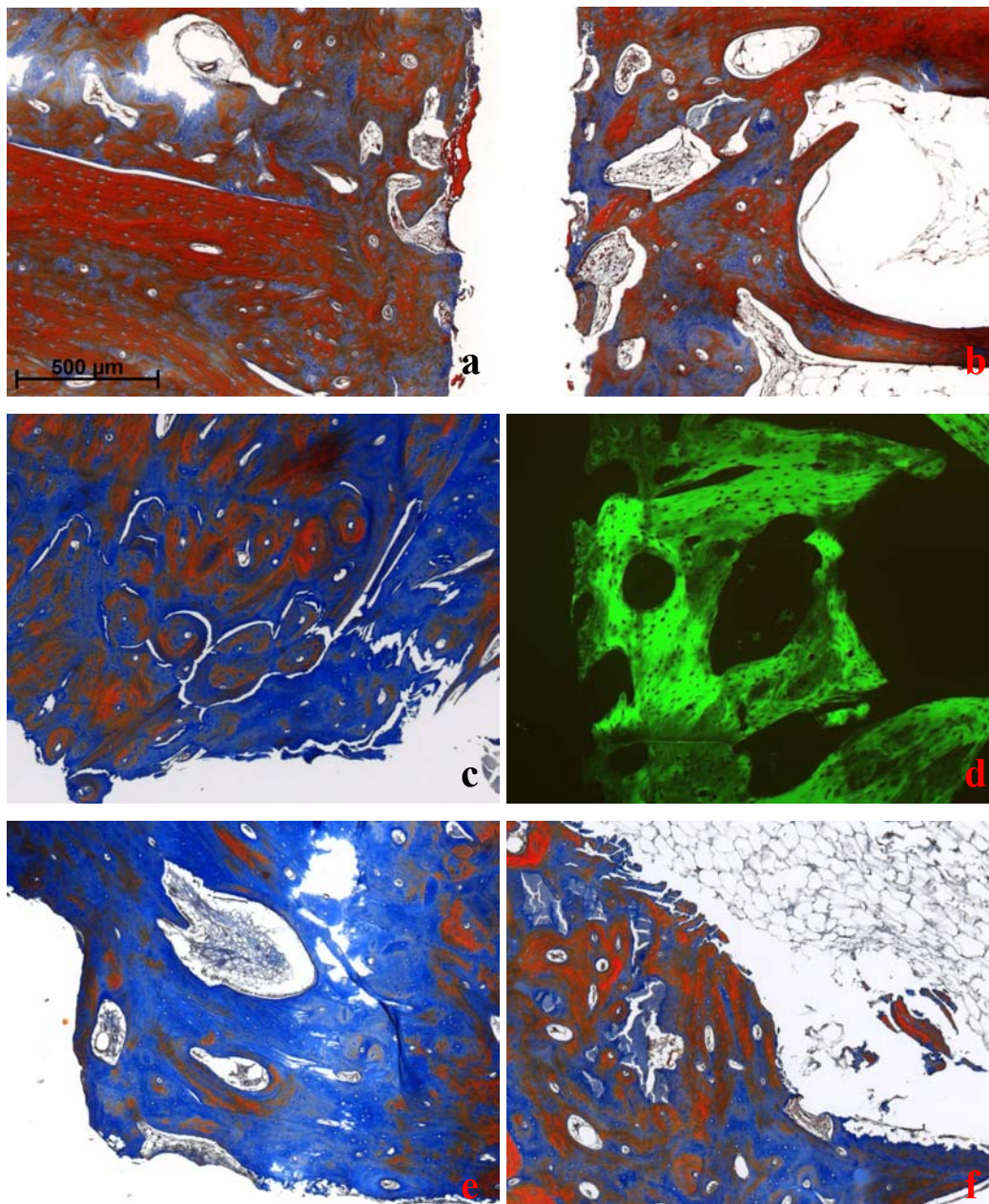


Abb. 48a-f: Bilder des Zylinderbettes von 20-Wochentieren ohne BMP-2 in 40facher Vergrößerung; d ist mit Fluoreszenzlicht zur besseren Darstellung der Knochenausrichtung aufgenommen; Färbung nach Masson-Goldner

7.2.3.2 *Dünnschliffe*

Nach dieser Methode wurden nur die Proben von zwei 9-Wochenschafen ausgewertet. Die Querübersichten aus Abb. 49 vermitteln einen guten Eindruck über die BMP-2-Wirkung. Hierzu sei jedoch gesagt, dass diese Implantate noch in die Femurkondylen eingesetzt wurden. Außerdem wurden diese Schliffe leider in zwei verschiedenen Ebenen angefertigt, links (Abb. 49a) im Bereich der Längsrillen und rechts (Abb. 49b) in der zirkulären Nut. Dennoch lässt sich auch hier eine vergleichende Aussage machen. Beim linken Zylinder kann man deutlich zwischen alter und neuer Spongiosa auf Grund der viel feineren Strukturierung differenzieren. Der neue Knochen ummantelt den Zylinder in dieser Ebene vollständig und füllt den ehemaligen Frässpalt komplett mit neuer Spongiosa aus. Sogar die Längsrillen sind vollständig mit Knochen durchwachsen. Im Dünnschliff des Placebozylinders ist schon die umgebende alte Spongiosa weniger dicht als links, was allerdings zum Teil daran liegt, dass dieser Zylinderteil etwas mehr im Markraum lag. Aber auch der Frässpalt ist fast leer. Direkt um den Zylinder herum hat sich eine dünne Knochenlamelle gebildet, die jedoch nur an wenigen Stellen Anschluss zum übrigen Knochen hat, das heißt den Sägespalt überbrückt. Im Gegensatz dazu sind auch die Längsrillen beim linken BMP-2-Zylinder von Knochen ausgefüllt. Hier wurde diese Vertiefungen gegenüber dem normalen Implantatniveau also überwunden. Außerdem zeigt der Längsschliff aus Abb. 50, dass beim linken Zylinder die zirkuläre Vertiefung zumindest in dieser Schnittebene fast vollständig von Knochen ausgefüllt ist. Das heißt, beim Verum wurde dieser Abstand sehr wohl überwunden, was hingegen beim Placebo in dieser Form nicht gelang. Schön lässt sich in Abb. 50 wiederum, besonders im rechten Bildausschnitt, der neue vom alten Knochen unterscheiden. Wobei die neugebildete Spongiosa viel dichter und mit zarteren Knochenbälkchen erscheint.

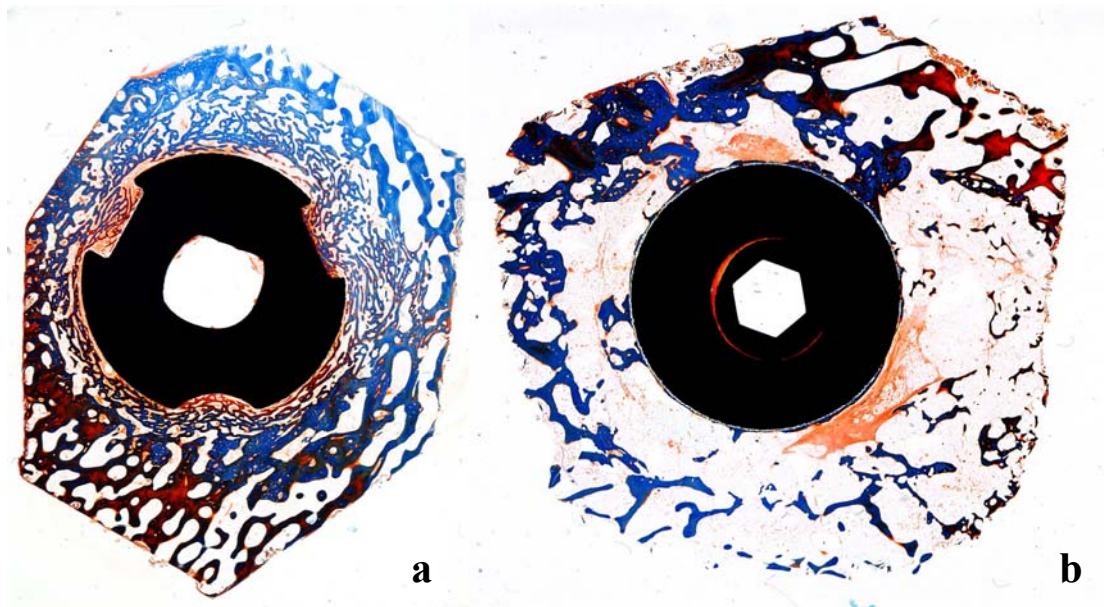


Abb. 49a und b: Zirkuläre Schliffe in Masson-Goldner-Färbung, wobei links das Verum und rechts das Placebo ist



Abb. 50: Längsschliff des Zylinders aus Abb. 49 in Masson-Goldner-Färbung im Bereich der zirkulären Nut

Die folgenden Bilder zeigen vergrößerte Darstellungen aus Abb. 49a. Schön ist hier noch einmal die massive Spongiosaneubildung, oft direkt bis ans Implantat zu sehen. Die Ausrichtung der Knochenbälkchen erscheint in diesen Schnitten meist zirkulär. Auch die Vertiefungen werden nahezu vollständig von Knochen ausgefüllt (Abb. 51c und d). Besonders Abb. 51d zeigt unter BMP-2 entstandenes vitales Knochenmark.

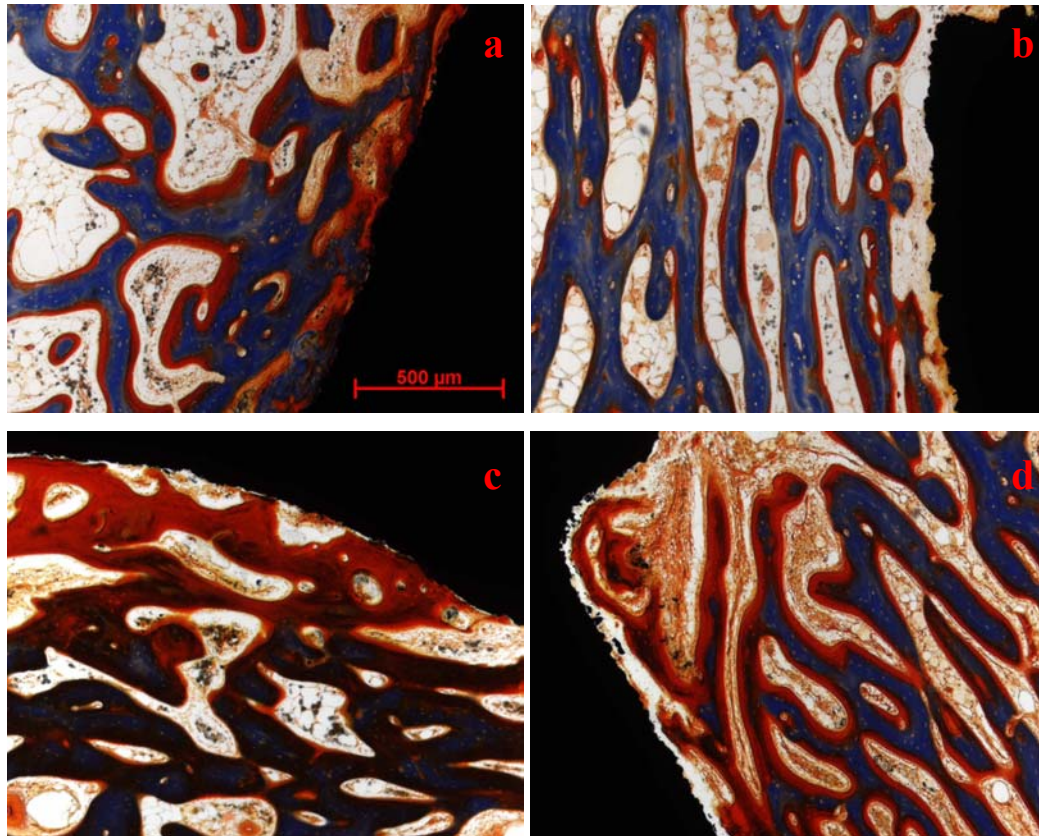


Abb. 51a-d: Zirkuläre Schiffe des BMP-2-Zylinders (aus Abb. 49a) (9 Wochen) nach Masson-Goldner in 8x5

Auch in den vergrößerten Darstellungen des Längsschliffes (Abb. 52) aus Abb. 50 zeigt sich, dass der Zylinder einschließlich der Zirkulärnut sehr gut von Knochen eingebaut wird. Hier sind die Knochenlamellen vor allem längs zum Zylinder ausgerichtet. Das heißt dieser BMP-2 beschichtete Zylinder ist also von einem dreidimensionalen Netz aus Knochentrabekeln umgeben. In Abb. 52b ist außerdem potentes Mark zu finden.

Abb. 53 zeigt dieses Knochenmark und eine hohe Zahl von Osteoblasten (Pfeile) als Zeichen der BMP-2-Aktivierung.

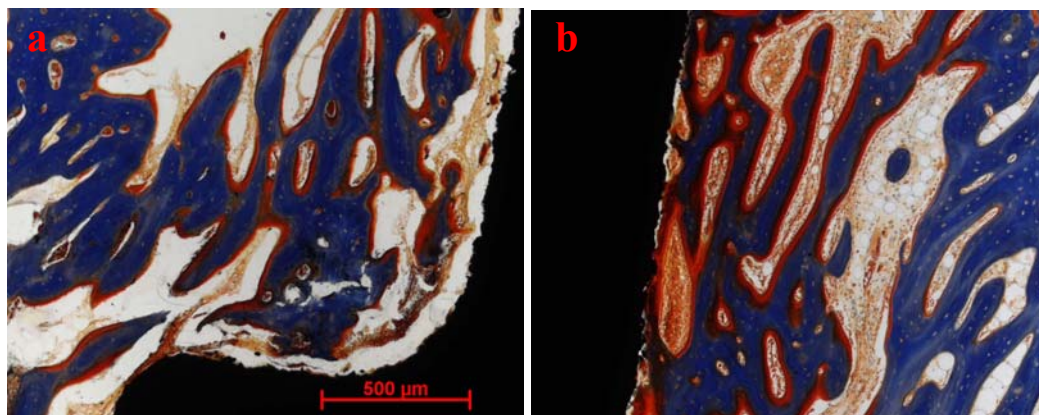


Abb. 52a und b: Längsschliffe des BMP-2-Zylinders (aus Abb. 50) (9 Wochen) nach Masson-Goldner in 8x5

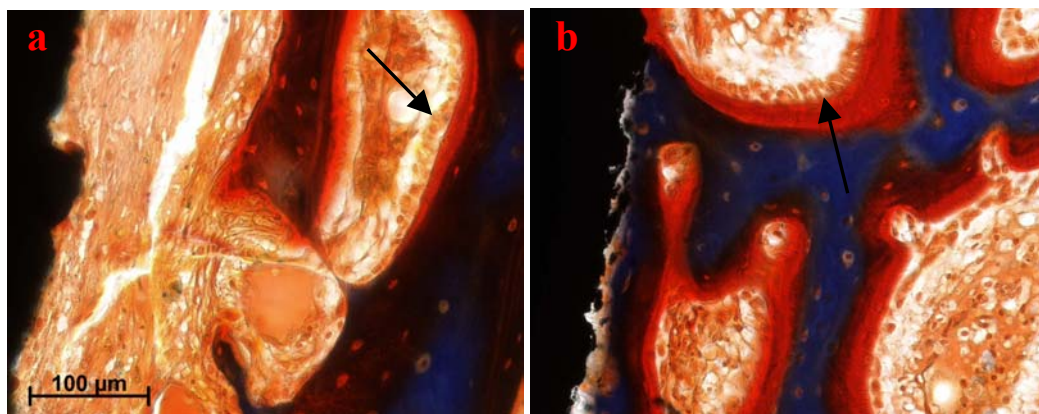


Abb. 53a und b: Osteoblasten beim BMP-2-Zylinder (9 Wochen) nach Masson-Goldner in 8x20

Beim unbeschichteten Zylinder war natürlich ebenfalls ein Einheilungsverhalten zu beobachten, wie die Bilder aus Abb. 54 und 55 beweisen. Aber dieses Einwachsen war sehr viel geringer ausgeprägt. Neuer Knochen hat sich nur zu einem kleinen Teil gebildet. Wenn überhaupt erfolgte der Einbau meist von der bestehenden Spongiosa oder Kompakta ausgehend (siehe auch Abb. 49b).

Vitales Knochenmark war ebenfalls nicht zu finden. Die Spongiosazwischenräume waren größtenteils von Fett ausgefüllt.

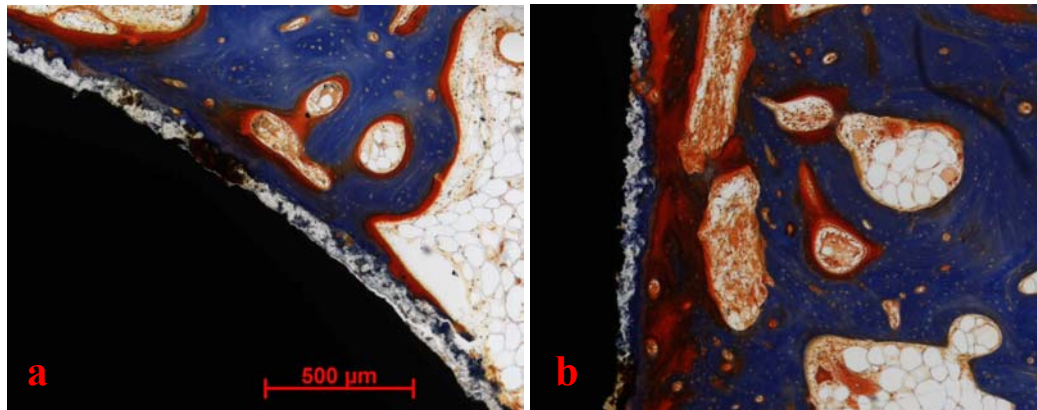


Abb. 54a und b: Bilder vom rechten unbeschichteten Zylinder (9 Wochen) nach Masson-Goldner in 8x5 (a zirkulär, b längs)

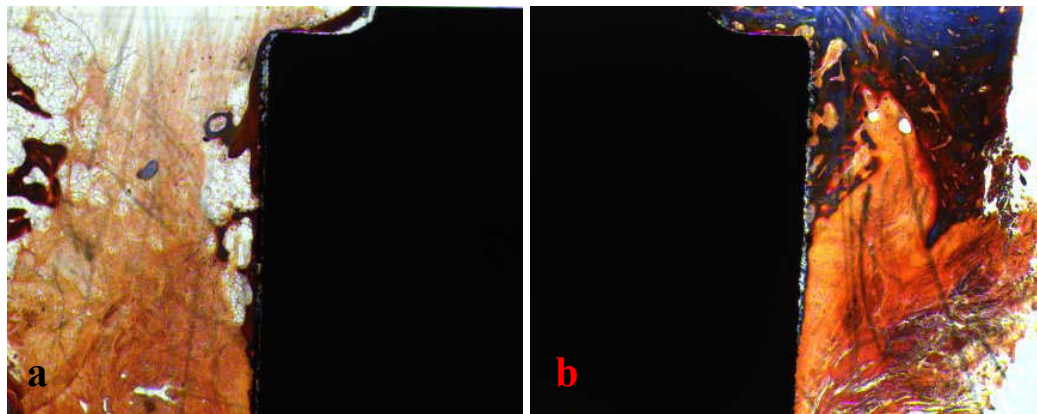


Abb. 55a und b: Übersicht eines rechten unbeschichteten Zylinders (9 Wochen) im Längsschliff nach Masson-Goldner in 10facher Vergrößerung

Untenstehende Bilder sind mit Alizarin S gefärbt, um die Mineralisation der neugebildeten Knochensubstanz nachzuweisen. Dargestellt sind hier Bilder vom Zylinder aus Abb. 49a (BMP-2 beschichtetes 9 Wochen altes Implantat). Deutlich ist hier die Rotfärbung zu erkennen, was beweist, dass es sich wirklich um mineralisierten Knochen handelt.

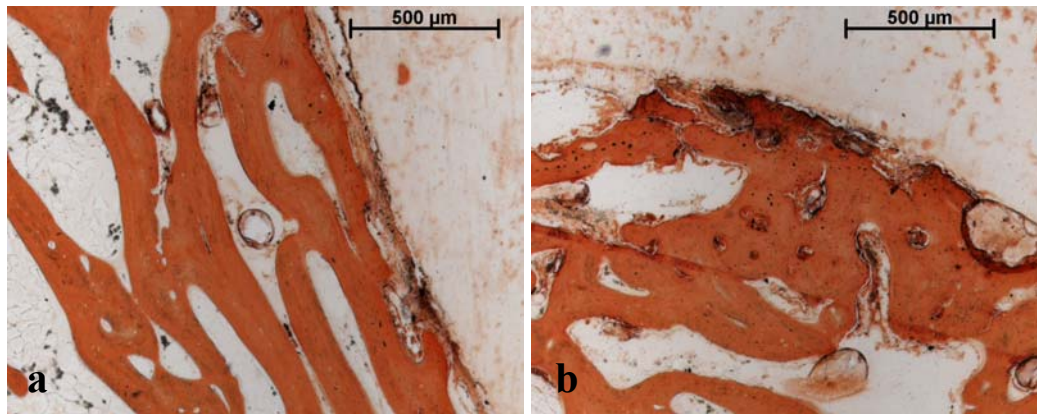


Abb. 56a und b: Querschliff eines 9 Wochen alten BMP-2-Zylinders mit Alizarin S in 40facher Vergrößerung

7.2.4 Ausrissversuche

Bei der Testung der 9-Wochentiere zeigten die BMP-2-Zylinder (linke Seite) mit einer Ausnahme eine geringere Ausrisskraft gegenüber den Placebozylindern (rechte Seite), wobei jedoch keine Signifikanz vorlag (Tab. 2).

Obwohl also die linken Zylinder histologisch und radiologisch in der Einheilung weiter fortgeschritten waren als die rechten, konnte dies beim Ausrissversuch nicht nachgewiesen werden.

Nach 20 Wochen war hingegen die Ausrisskraft der BMP-2-Zylinder gegenüber den Placebos deutlich höher (außer bei Tier 24) (Tab. 3). Neben der besseren histologischen und radiologischen Einheilung der linksseitigen Implantate bestand nun auch eine signifikant höhere mechanische Festigkeit.

Abb. 57 und 58 zeigen die Auszugskurven je eines 9- und 20-Wochentieres, Abb. 59 zeigt die Boxplot-Statistik aller gemessenen Schafe.

Schaf-Nr.	OP-Tag	Entnahme/ Ausrisstag	Standzeit in Tagen	Standzeit in Wochen	Messwert in Newton Linke Seite	Messwert in Newton Rechte Seite
9	17.01.03	26.03.03	68	9.7	264.312	604.273
11*	21.01.03	06.03.03	50	7.1	39.225	464.234
12	21.01.03	26.03.03	64	9.1	989.293	611.803
13	27.01.03	31.03.03	63	9.0	1066.999	1204.489
14	27.01.01	31.03.03	63	9.0	789.421	1459.421
15**	27.01.03	02.04.03	65	9.3	0.0	591.911
18	28.01.03	02.04.03	64	9.1	69.480	481.940

Tab. 2: Ergebnisse der 9-Wochentiere; *Nr. 11 ist bei Transport gestorben (d. h. der Versuch fand erst einige Stunden nach dem Tod statt); ** Bei Nr. 15 hatte sich schon vor dem Ausriss der linke Zylinder gelockert. Ob das Implantat nicht eingewachsen war oder sich während des Sägens gelockert hat ist ungewiss. Deshalb ist für die linke Seite dieses Tieres der Wert Null eingetragen.

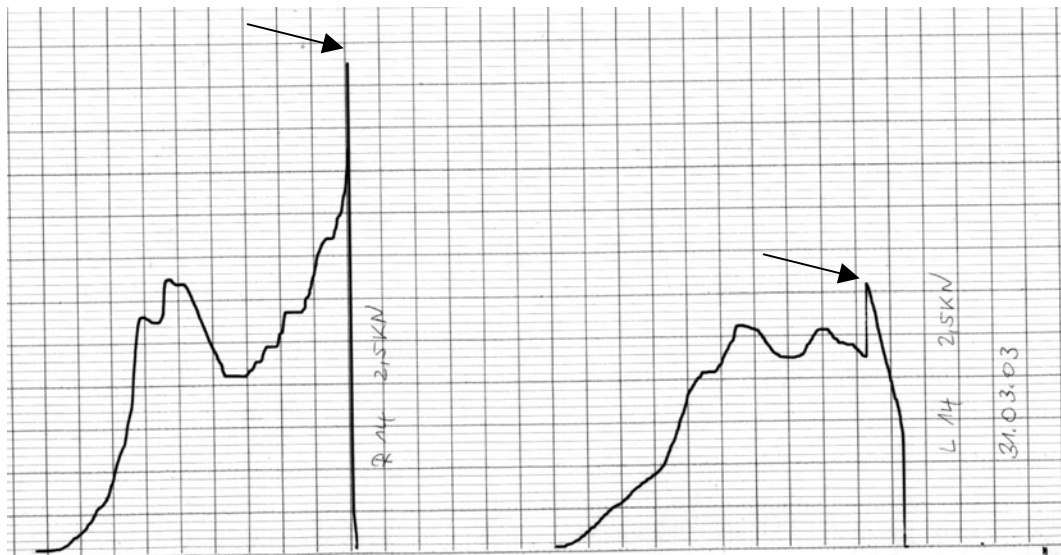


Abb. 57: Ausrisskurve eines 9-Wochentieres (Schaf 14); die Pfeile markieren den gemessenen Ausrisspeak

Schaf-Nr.	OP-Tag	Entnahme / Ausrisstag	Standzeit in Tagen	Standzeit in Wochen	Messwert in Newton Linke Seite	Messwert in Newton Rechte Seite
19	04.02.03	27.06.03	143	20.4	2164.509	1059.362
20	04.02.03	27.06.03	143	20.4	2894.450	1664.460
21	06.02.03	23.06.03	137	19.6	3109.548	1414.509
24	08.05.03	29.09.03	145	20.7	2964.558	3064.548
25	09.05.03	29.09.03	144	20.6	1864.568	964.519

Tab. 3: Ergebnisse der 20-Wochentiere

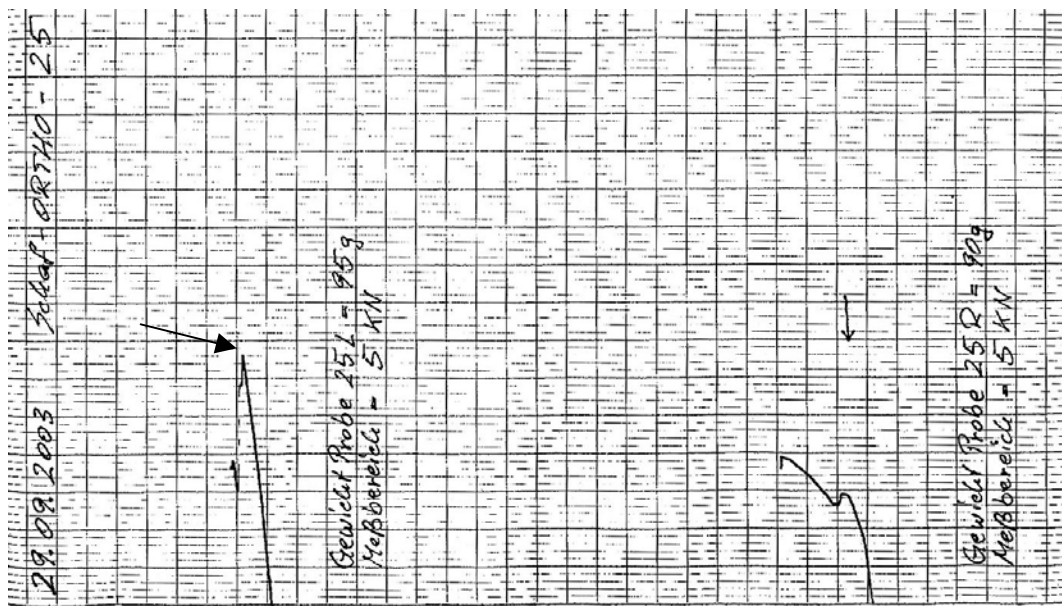


Abb. 58: Ausrisskurve eines 20-Wochentieres (Schaf 25); die Pfeile markieren den gemessenen Ausrisspeak

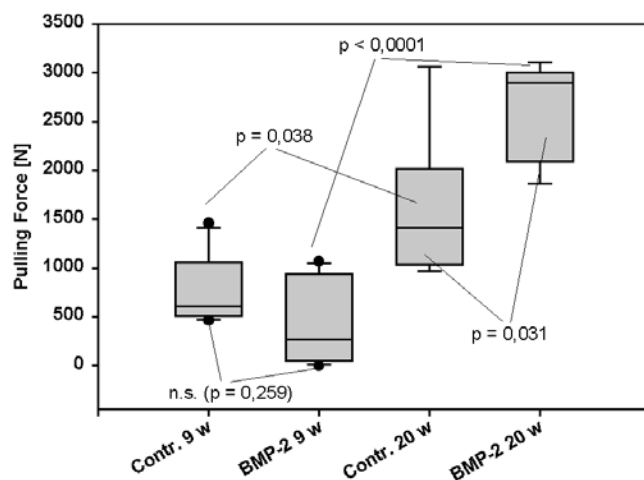


Abb. 59: Boxplot-Statistik für alle gemessenen 9- und 20-Wochentiere

Begründen lässt sich das schlechtere Abschneiden der BMP-2-Zylinder bei den 9-Wochentieren folgendermaßen: Bei den mit BMP-2 beschichteten Zylindern war nach 9 Wochen ein enormer Knochenumsatz mit hoher zellulärer Aktivität zu finden. Durch die knocheninduktive BMP-2-Wirkung entstand in hohem Maß neuer spongiöser Knochen. Auch zwischen alter Kompakta und Implantat bildeten sich zarte Trabekel aus. Es liegt zu dieser Zeit also erst ein beginnendes Einheilungsstadium vor. Die Organisation und Ausrichtung des neuen Knochens fand noch nicht ausreichend statt, was die verminderte Festigkeit des Implantates bedingt.

Bei den nicht BMP-2 beschichteten Zylindern fehlte die knocheninduktive Wirkung. Somit entstand auch kein spongiöser Knochen im Bereich der Kompakta. Sondern durch die konduktive Wirkung des HA bildete sich beim rechten Zylinder zwischen Kompakta und Implantat eine Verbindung aus, die zu diesem Zeitpunkt den linken Zylindern überlegen war (siehe Abb. 37).

Nach 20 Wochen kann man hingegen auf der linken Seite von einer abgeschlossenen Einheilung sprechen. Die zwischen Zylinder und alter Kompakta neu gebildeten Knochenbälkchen sind jetzt in die umliegende Kompakta integriert worden. Die Ausrichtung dieses neuen Knochens ist parallel zur Zylinderlängsachse wie auch zirkulär angelegt. Diese Art der Adaptation wird hingegen auf der rechten Seite nicht erreicht (siehe Abb. 45 und 46).

8. Diskussion

8.1 Ergebnisse der Tiermodelle

8.1.1 Kaninchenmodell

Eine toxische Wirkung des BMP-2 oder andere Nebenwirkungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Das BMP-2, zusammen mit der HA-Beschichtung, führte zu einer Beschleunigung der Einheilung der Implantate im Vergleich zur völlig unbeschichteten Seite. Gegenüber der reinen HA-Beschichtung ohne BMP-2 hatte die kombinierte Anwendung beider Substanzen keinen Vorteil.

Hassan et al. (2001) untersuchte mit HA und rhBMP-2 beschichtete „Onplants“ am Schädeldach des Kaninchens. Ähnlich wie wir fand er heraus, dass BMP-2 zu einer beschleunigten Einheilung führte. Allerdings war in seiner Studie die kombinierte Anwendung von HA und BMP-2 im Einheilen besser als die reine HA-Beschichtung. Vehof et al. (2001) stellte fest, dass rhBMP-2-beschichtete Titannetzkörper, welche er Ratten subkutan in den Rücken implantierte, die Bildung von Knochen induzierten. Esenwein et al. (2001) implantierte mit HA und BMP-3 beschichtete Titankörper in den distalen Femur von Kaninchen. Im Ergebnis führte das BMP-3 nach 2, 5 und 8 Wochen Standzeit zu einer deutlich besseren Einheilung als bei der reinen HA-Beschichtung. Jedoch ist das hier verwendete BMP ein Extrakt aus Schweinefemora, der verschiedene BMPs enthält und fälschlicherweise als BMP-3 bezeichnet wird.

Die Ergebnisse unserer Studie sind denen der hier angeführten Arbeiten sehr ähnlich. Ein möglicher Grund für die Wirkung der alleinigen HA-Beschichtung wäre, dass der Stoffwechsel der sehr jungen Kaninchen (zum Teil Wachstumsfugen noch nicht geschlossen) die Einheilung noch mehr beschleunigt hat, als beim erwachsenen Tier.

8.1.2 Schafmodell

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen adulte Mutterschafe im Alter von 8 bis 12 Jahren. Diese Tiere waren durch eine extrem rarefizierte Knochenstruktur und leeres aosteoblastäres Fettmark gekennzeichnet (siehe Abb. 11 in 4.6). Wir wählten dieses Modell, weil wir untersuchen wollten, ob BMP-2 auch unter solchen schlechten Ausgangsbedingungen zu einer Verbesserung der Implantateinheilung führt. Dadurch sollte

eine Aussage gewonnen werden, ob durch BMP-2 auch beim alten Menschen mit osteoporotischem Knochen das Einheilen von Implantaten verbessert werden kann. In bisherigen Arbeiten (siehe unten) wurden immer jüngere Tiere mit optimalen Einwachsbedingungen verwendet. Diese erlauben aber nur bedingt eine Aussage darüber, ob BMP-2 auch am osteoporotischen Knochen den Einheilungsprozess von Implantaten fördert.

Eine toxische Wirkung des BMP-2 oder andere Nebenwirkungen konnten auch am Schaf nicht nachgewiesen werden.

Die mit BMP-2-behandelten Implantate zeigten sowohl histologisch als auch radiologisch ein besseres und schnelleres Einwachsverhalten als die Kontrollen. Das BMP-2 führte zu einer enormen Aktivierung von Regenerationsprozessen einschließlich der Umwandlung von Vorläuferzellen aus dem Fettmark in Osteoblasten und damit zur Bildung von neuem Knochen mit folgender Reorientierung zum Implantat und Kompaktierung dieses Knochens.

Diese Ergebnisse waren in der Form in anderen Untersuchungen mit höheren Tieren, wie Hunden oder Schafen nicht wiederzufinden. Lichtinger et al. (2001) implantierte Schafen rhBMP-2-beschichtete Titanimplantate, die unseren sehr ähnlich waren, in die Femurkondylen. Die mit BMP-2 behandelten Implantate zeigten nach 4 und 9 Wochen eine erhöhte Knochenbildung und eine bessere Integration, als die Kontrollen. Dies entspricht unseren Ergebnissen. Zwar wurden in dieser Arbeit adulte Milchschafe (bestimmte Rasse) - jedoch ohne Altersangabe - verwendet. Es handelte sich somit wahrscheinlich nicht um alte Tiere wie in unserer Studie. Weiterhin wird nur über die Menge der Knochenbildung berichtet, nicht aber über die qualitative Ausrichtung. Kessler et al. (2003) testete rhBMP-2-beschichtete Glaskeramikimplantate an adulten Schafen. Die Implantation erfolgte ähnlich wie in unserer Studie im medialen Tibiakopf. Nach 4 Wochen und 9 Monaten wiesen die mit BMP-2 behandelten Implantate eine höhere Neubildung an Knochenmasse und bessere Integration auf als die Kontrollen (nach 9 Monaten aber nicht mehr signifikant). Allerdings fehlt auch nach 9 Monaten die trajektorielle Ausrichtung in der BMP-2-Gruppe. Des weiteren wurden auch hier zwar adulte aber nicht alte Schafe verwendet. In der Studie von Murakami et al. (2003) erhielten Hunde (Beagle) Hüftprothesen mit einer rhBMP-2-Beschichtung implantiert. Nach 2, 4, 6 und 12 Wochen erfolgten radiologische Verlaufskontrollen, die ein verbessertes Einheilenverhalten der mit BMP-2 behandelten Prothesen ergaben. Diese Aussage wurde durch die histologischen Bilder nach 12 Wochen und 6 Monaten bestätigt. In den Röntgenbildern fand er ein

Remodelling des neugebildeten kortikalen Knochens nach 6 Monaten. In den histologischen Bildern wird nur von einer normalen Knochenhistologie und Trabekelbildung gesprochen, nicht aber ob es zu einer gerichteten Ausbildung der Trabekel und des kortikalen Knochens kommt. Bei den verwendeten Hunden handelt es sich wiederum nicht um alte Tiere.

Die Ergebnisse anderer Studien stimmen also in einigen Punkten durchaus mit unseren eigenen überein. In den oben angeführten Arbeiten sind aber immer nur adulte Tiere verwendet worden. Auf Versuche mit wirklich alten Tieren gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise. Unseres Wissens nach ist das die erste Studie, die rekombinantes humanes BMP-2 in alten osteoporotischen Mutterschafen getestet hat. Die in unserer Arbeit ausführlich dokumentierte Ausrichtung bzw. Reorientierung des neuen Knochens fehlt aber in anderen Arbeiten. Hier wird meist nur die Neubildung von Knochen an sich (Lichtinger et al., 2001) oder eine unzureichende Ausrichtung des Knochens (Kessler et al., 2003) diskutiert. Murakami et al. (2003) schreibt, dass er radiologische Beweise für ein Remodelling fand. Allerdings geht er nicht darauf ein, in welcher Form dieses stattfindet. Sumner et al. (2004) erkannte ähnlich wie wir eine Resorption von altem Knochen, jedoch wird nicht beschrieben, ob der an dieser Stelle neu aufgebaute Knochen Kriterien eines aktiven Remodellings aufweist.

Des weiteren fanden wir keine Spuren von enchondraler Ossifikation, obwohl andere Autoren davon berichten (Vehof et al., 2001). Hier handelt es sich aber um eine ektope Knocheninduktion. Doch auch Paramore et al. (1998), der bei Hunden eine lumbale Fusion von Wirbelkörpern mittels BMP-7 durchführte, fand Chondrozyten. Ähnlich diesem Fall konnte auch Kandziora et al. (2002) bei der Spondylodese der Halswirbelsäule an Schafen mit BMP-2 Knorpelnester nachweisen. Darüber hinaus gibt es jedoch viele Untersuchungen, die nicht von Knorpelzellen berichten (Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003). Sumner et al. (2004) führte Implantateinheilungsversuche an Hunden durch und beschreibt explizit, dass kein Beweis für ein fibrocartilaginäres Stadium gefunden wurde. Vielleicht war der Untersuchungszeitpunkt bei den Schafen in unserer Arbeit zu spät, um noch Chondrozyten zu finden, oder es gab keine Vorläuferzellen im Fettmark für den enchondralen Weg. Allerdings sahen wir bei den Kaninchenversuchen ebenfalls keine Knorpelzellen, obwohl hier die genannten Voraussetzungen vorhanden waren.

Die Ausreißversuche zeigten nach 20 Wochen eine signifikant höhere Stabilität für die mit BMP-2 behandelten Implantate an. 9 Wochen postoperativ war dies interessanterweise noch umgekehrt. Jedoch zeigte dieser Unterschied keine Signifikanz.

Einen Versuch dieser Art führte Hassan et al. (2001) mit rhBMP-2 beschichteten „Onplants“ an Kaninchen durch. Er stellte fest, dass schon nach 6 Wochen die BMP-2-beschichteten Implantate fester im Knochen verankert waren als die Kontrollen. Dies stimmt durchaus mit unseren Werten überein, obwohl bei unseren Schafen dieser Unterschied erst nach 20 Wochen, auf Grund der viel schlechteren Regenerationsmöglichkeiten der alten Tiere, auftrat. Kessler et al. (2003) führte mechanische Druckversuche an Tibiae von Schafen durch, die mit rhBMP-2 beschichtete Glaskeramiken implantiert bekamen. Nach 4 Wochen erzielten die Knochenblöcke, die das BMP-2-beladene Keramikstück enthielten, eine höhere Druckfestigkeit, als die Kontrollen (Keramiken ohne Beschichtung). Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Nach 9 Monaten war er dann völlig verschwunden.

8.2 Eignung und Probleme der Tiermodelle

Man muss die Frage stellen, ob das Kaninchenmodell, vom Toxizitätsausschluss abgesehen, zur Beurteilung des Einheilens von Implantaten, geeignet ist. Auch bei nicht ganz optimalen Ausgangsbedingungen (z. B. nur HA ohne BMP-2) kommt es in unserer Versuchsreihe zu einer enormen Reaktion des Knochens mit gleichwertigem Einheilverhalten. Der Grund dafür könnte der überaus schnelle Stoffwechsel besonders des jungen Kaninchens sein. Die Knochenanbaurate beim Kaninchen ist mit 62,7mg/Tag bis 69,5mg/Tag wesentlich höher als die des Menschen (1,0mg/Tag bis 1,5mg/Tag) (Esenwein et al., 2001). Dennoch hält Esenwein dieses Modell für geeignet, übertragbare Aussagen für den menschlichen Knochen zu gewinnen. Schlickewei and Paul (1991) zeigten, dass ein 5mm großer Bohrlochdefekt beim Kaninchen nicht spontan überbrückt wird. Auch Katthagen, (1987) hält die spontane Regenerationsleistung im spongiösen Lager des Kaninchens für begrenzt.

Das Schafmodell eignet sich für weitere Versuche dieser Art, denn es ermöglicht gut die Beobachtung über das unterschiedliche Einwachsen von Implantaten am Großtier. Schafe haben eine Knochenumsatzkinetik, die der des Menschen sehr ähnlich ist (Geusens, 1992). Die Mutterschafe weisen weiterhin Ähnlichkeiten zum Hormonprofil von Frauen auf (Goodman, 1994). Allerdings besitzen sie keine klare Menopause (Newman et al., 1995). Das hohe Alter der Tiere ist allerdings für die Durchführung des Versuchs auch ein Nachteil bei diesem Modell. Zwei Schafe starben während der Versuchslaufzeit einen natürlichen Tod, wahrscheinlich durch Herzkreislaufversagen. Weitere fünf Tiere mussten

auf Grund von periimplantären Frakturen, innerhalb der ersten zwei Wochen postoperativ, vorzeitig getötet werden. Ursache dafür war zum einen, dass operationsbedingt ein wichtiger tibialer Knochenpfeiler beschädigt wurde, zum anderen aber auch die schlechte Knochensituation bedingt durch das hohe Alter der Tiere.

8.3 Histologische Auswertungsverfahren

Zur histologischen Verarbeitung der Kaninchenproben ist ausschließlich die Dünnschliffmethode eingesetzt worden, da nur durch dieses Verfahren verwertbare Präparate garantiert waren. Bei den Schafen wurde die Dünnschliffmethode nur für die Proben von zwei Tieren verwendet, obwohl hierdurch sehr gute mikroskopische Präparate entstanden. Allerdings war diese Methode neben anderen Nachteilen sehr kostenintensiv. Somit wurde dieses Verfahren nur genutzt, um beschreibende Aussagen zu erlangen. Um repräsentative Ergebnisse zu bekommen wurden die restlichen Proben konventionell weiterverarbeitet, das heißt erst entkalkt und dann geschnitten. So war es möglich von einer Probe mehrere Schnitte aus der gleichen Region zu bekommen. Bei den Dünnschliffen wäre dies nicht möglich gewesen, da bei einem Schliff das umliegende Material zerstört wird. Deshalb waren Schliffe der gesamten Probe nach dieser Methode auch nur in einer Ebene möglich, denn für die zweite Ebene stand nicht mehr die gesamte Probe zur Verfügung. Ein Nachteil der entkalkten Schnitte war, dass der Zylinder immer erst entfernt werden musste, wodurch die unmittelbare Kontaktzone zwischen Zylinder und Implantat natürlich zerstört wurde.

Durch die Histologie wurden in unserer Arbeit auch keine messbaren Werte, z. B. über die Menge des gebildeten Knochens oder der vorhandenen Osteoblasten gewonnen. In ähnlichen Studien wurde hingegen oft eine Histomorphometrie durchgeführt (Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003; McGee et al., 2003). Wir haben das nicht getan, da genaugenommen dafür eine schichtweise Aufarbeitung der gesamten Probe notwendig gewesen wäre. Trotzdem würde der Gewebeverlust bei der Probenverarbeitung die statistische Aussage nochmals verfälschen.

8.4 Ausrissversuche

Die Wirkung der hierbei gemessenen Zugkraft ist für die stabile Verankerung einer Prothese nicht so entscheidend. Bei der Hüftprothese z. B. kommt es vor allem auf Kipp- und Rotationsstabilität an. Eine Messung dieser Kräfte war allerdings nicht möglich gewesen. Folgende Autoren verwendeten zwar kein BMP, wählten aber einen ähnlichen

technischen Ansatz für die Messung der Stärke der Implantatverankerung im Knochen wie wir (Spivak et al., 1990; Aebli et al., 2003; Cook et al., 1988). Spivak und Aebli zogen die Implantate aus dem Knochen heraus und maßen die dafür nötige Kraft. Cook drückte die Implantate heraus und maß den aufgewendeten Druck.

Die Ergebnisse unserer Zugkraftmessung sind wie die Messergebnisse der oben angeführten Arbeiten auch nur ein indirektes Maß für die Verankerung und Integration des Implantats im Knochen.

8.5 Anzahl der verwendeten Tiere

Insgesamt wurden 18 Schafe ausgewertet. Für die Ausreißversuche wurden sieben 9-Wochentiere und fünf 20-Wochentiere verwendet, wodurch sogar eine statistisch relevante Auswertung gelang. Histologisch und radiologisch wurden alle 18 Proben ausgewertet. Die Erhöhung der Tierzahl war allerdings aus Kostengründen nicht möglich.

8.6 Verwendete BMP-2-Dosis

Die von uns verwendete BMP-2-Dosis ($100\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ist ein weiterer wichtiger Punkt. Es gibt Autoren, die eine Abhängigkeit der BMP-2-Wirkung von der verabreichten Dosis festgestellt haben. Murakami et al. (2003) unterschied drei Dosierungen: $100\mu\text{g}$, $500\mu\text{g}$ und $1000\mu\text{g}$. Dies entspricht ca. einer BMP-2-Menge pro Quadratzentimeter von $16\mu\text{g}$, $83\mu\text{g}$ und $167\mu\text{g}$, wobei die zu beschichtende Fläche 6cm^2 betrug. Murakami stellte fest, dass die Menge des gebildeten Knochens mit der Dosis korrelierte. Als optimal stellte er die $500\mu\text{g}$ -Gruppe heraus, da die höchste Dosierung zu einer überschießenden Knochenbildung führte. Ebenfalls drei verschiedene Dosierungen ($100\mu\text{g}$, $400\mu\text{g}$ und $800\mu\text{g}$ pro Implantat) verwendete Sumner et al. (2004) bei Hunden. Am Versuchsende nach 4 Wochen war der prozentual ins Implantat (Porocoat[®]-Beschichtung) eingewachsene Knochen in der $100\mu\text{g}$ -Gruppe am größten. Das Volumen an neugebildetem Knochen war aber in der $800\mu\text{g}$ -Gruppe am größten. Sumner beschreibt, dass es in der $800\mu\text{g}$ -Gruppe bei jedem Tier und in der $100\mu\text{g}$ -Gruppe bei keinem Tier zur Knochenresorption kam. Diese Räume sind dann durch neuen trabekulären Knochen aufgefüllt worden. Dies entspricht auch unseren Beobachtungen, denn auch wir konnten diese Resorption, dann aber mit anschließendem Remodelling, feststellen. Es ist durchaus möglich, dass bei einer geringeren Konzentration die enormen Umbauvorgänge nach 9 Wochen geringer ausgefallen wären und damit zu einem besseren Ergebnis der BMP-2-Seite im Ausrissversuch zu diesem Zeitpunkt geführt hätte.

9. Schlussfolgerung

Untersuchungen am Klein- und Großtier haben bewiesen, dass rhBMP-2 die Einheilung von Knochenimplantaten verbessert (Lichtinger et al., 2001; Kessler et al., 2003; Sumner et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass rhBMP-2 auch beim alten Schaf mit osteoporotischem Knochen in der Lage ist, eine beschleunigte Einheilung und eine verbesserte knöcherne Integration von Titanimplantaten herbeizuführen.

Es ist davon auszugehen, dass bei zweckmäßiger Anwendung auch am Mensch der Prozess der Implantateinheilung positiv beeinflusst wird, im Besonderen natürlich beim alten Menschen, dessen Knochensituation durch unser Versuchsmodell nachempfunden werden sollte. Legt man unsere Ergebnisse zu Grunde, könnte es also speziell in dieser Patientengruppe sinnvoll sein, das BMP-2 als zusätzliche Implantatbeschichtung einzusetzen.

Da BMP-2 schon mit Erfolg in klinischen Studien zur Wirbelkörperfusion (Burkus et al., 2002; 2003) oder zur Überbrückung von Knochendefekten (Govender et al., 2002) getestet wurde, sind also schon Erfahrungen über den Einsatz am Menschen vorhanden.

Hinsichtlich des durch das BMP-2 verursachten Remodellingeffekts müssen weitere auch klinische Studien zeigen, welche Dosierung die geeignetste ist. Möglicherweise könnte eine zu hohe BMP-2-Dosis zu einer postoperativen Prothesenlockerung führen. Ebenso wäre eine überschießende Knochenbildung (Murakami et al., 2003) möglich. Eine optimale BMP-2-Dosis sollte also ein begrenztes Remodelling herbeiführen, ohne dabei die Prothese zu lockern.

Um Aussagen treffen zu können, inwieweit das BMP-2 die Lebensdauer von Implantaten beeinflusst, sind weitere vor allem klinische Langzeituntersuchungen erforderlich.

10. Literaturverzeichnis

- Aebli, N., Krebs, J., Stich, H., Schawalder, P., Walton, M., Schwenke, D., Gruner, H., Gasser, B. and Theis, J.C. (2003). In vivo comparison of the osseointegration of vacuum plasma sprayed titanium- and hydroxyapatite-coated implants. *J Biomed Mater Res A* **66**: 356-363.
- BMBF-Schlussbericht AZ 0312558 (2003).
- Bostrom, M.P., Lane J.M., Berberian W.S., Missri A.A., Tomin E., Weiland A., Doty S.B., Glaser D., Rosen V.M. (1995). Immunolocalization of expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* **13**: 357-367.
- Burkus, J.K., Gornet, M.F., Dickman, C.A. and Zdeblick, T.A. (2002). Anterior Lumbar Interbody Fusion Using rhBMP-2 With Tapered Interbody Cages. *J Spinal Disord Tech* **15**: 337-349.
- Burkus, J.K., Dorchak, J.D. and Sanders, D.L. (2003). Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. *Spine* **15**: 372-377.
- Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A. and Wozney, J.M. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9843-9847.
- Cook, S.D., Thomas, K.A., Kay, J.F. and Jarcho, M. (1988). Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implant applications. *Clin Orthop*. **232**: 225-243.
- DePuy. Porocoat-A Technical Review of Porous-Coated Implants for Biological Fixation.
- DePuy-BioTech Jena GmbH (2004). Knochenersatzmaterialien zur Therapie der Osteoporose. Vorhabensbeschreibung zum Förderprogramm "BioChancePLUS".
- Ducy, P. and Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International* **57**: 2207-2214.
- Dunbar, M.J., Blackley, H.R. and Bourne, R.B. (2001). Osteolysis of the femur: principles of management. *Instrum Course Lect* **50**: 197-209.
- Esenwein, S.A., Esenwein, S., Herr, G., Muhr, G., Küsswetter, W. and Hartwig, C.-H. (2001). Osteogene Aktivität BMP-3-beschichteter Titanprüfkörper

unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit im orthotopen Lager des Riesenkaninchens. *Chirurg* **72**: 1360-1368.

- Geusens, P. (1992). Photon absorptiometry in osteoporosis. Bone mineral measurements in animal models and humans. Ph. D. thesis, Katholieke Universiteit Leuven Fakulteit Geneeskunde, Department of Reumatologie Arthritis en Metabole Botziekten Onderzoekseenheid.
- Graff, J.M., Bansal, A. and Melton, D.A. (1996). Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* **85**: 479-487.
- Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. Knobil, E. and Neill, J. eds. *Physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press: 659-709.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A. and Wisniewski, T.; BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* **84-A**: 2123-2134.
- Groeneveld, E.H.J. and Burger, E.H. (2000). Bone Morphogenetic proteins in human bone regeneration-Review. *European Journal of Endocrinology* **142**: 9-21.
- Hassan, A.H., Evans, C.A., Zaki, A.M. and George, A. (2003). Use of Bone Morphogenetic Protein-2 and Dentin Matrix Protein-1 to Enhance the Osteointegration of the Onplant System. *Connective Tissue Research* **44**: 30-41.
- Herold, G. (2004). *Innere Medizin*. Köln. S. 645-649.

- Hortschansky, P., Erdmann, S., Schmuck, K.D., Sachse, A. und Venbrocks, R. (2002). Funktionelle Implantatbeschichtung mit rekombinantem BMP-2. Poster, Deutscher Orthopädenkongress, 25.-28.09.2002, Berlin.
- Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A. and Wozney, J.M. (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* **13**: 291-300.
- Jennissen, H.P. (2000). Verträglichkeit groß geschrieben-Neue Wege zur Bioverträglichkeit von Materialien durch gezielte Oberflächenmodifikation. *Essener Unikate* **13**.
- Kandziora, F., Scholz, M., Pflugmacher, R., Krummrey, G., Schollmeier, G., Schmidmaier, G., Schnake, K.J., Duda, G., Raschke, M. und Haas, N.P. (2002). Experimentelle Spondylodese der Schafshalswirbelsäule. Teil 2: Der Effekt von Wachstumsfaktoren und Carrier-systemen auf die intervertebrale Fusion. *Chirurg* **73**: 1025-1038.
- Katthagen, B.D. (1987). Knocheninduktion mit Bone Morphogenetic Protein (BMP). *Z Ortho Ihre Grenzgeb* **125**: 559-566.
- Kessler, S., Mayr-Wohlfart, U., Ignatius, A., Puhl, W., Claes, L. and Günther, K.P. (2003). Der Einfluss von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) auf Osteointegration, Degradation und biomechanische Eigenschaften eines synthetischen Knochenersatzstoffes. *Z Orthop* **141**: 472-480.
- Kingsley, D.M., Bland, A.E., Grubber, J.M., Marker, P.C., Russell, L.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* **71**: 399-410.
- Kingsley, D.M. (1994). the TGF-[beta] Superfamily: New Members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**: 133-146.
- Leonhardt, H. (1990). Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. GeorgThieme Verlag Stuttgart-New York. 8. Auflage S. 137-151.
- Li, R.H. and Wozney, J.M. (2001). Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins-Review. *TRENDS in Biotechnology* **19**: 255-265.
- Lichtinger, T.K., Müller, R.T., Schürmann, N., Oldenburg, M., Wiemann, M., Chatzinikolaïdou, M., Rumpf, H.M. and Jennissen, H.P. (2001). Osseointegration of

Titanium Implants by Addition of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2). *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **32**: 937-941.

- Lind, M., Eriksen, E.F. and Bünger, C. (1996). Bone Morphogenetic Protein-2 but not Bone Morphogenetic Protein-4 and -6 Stimulates Chemotatic Migration of Human Osteoblasts, Human Marrow Osteoblasts and U2-OS Cells. *Bone* **18**: 53-57.
- Lord, G. and Bancel, P. (1983). The madreporic cementless total hip arthroplasty. *Clin Orthop* **176**: 67-76.
- Lyons, K.M., Pelton, R.W. and Hogan, B.L.M. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse. RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* **109**: 833-844.
- Lyons, K.M., Nove, J., Celeste, A.J. Wozney, J.M. and Rosen, V. (1995). Localization of RNAs encoding BMP receptors and their ligands during skeletal development. *Trans Orthop Res Soc 41st Annual Meeting* **20**: 276.
- Malchau, H., Herberts, P. and Ahnfelt, L. (1993). Prognosis of Total Hip Replacement in Sweden. Follow up of 92675 Operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand* **64**: 497-506.
- McGee, M.A., Findlay, D.M., Howie, D.W., Carbone, A., Ward, P., Stamenkov, R., Page, T.T., Bruce, W.J., Wildenauer, C.I. and Toth, C. (2004). The use of OP-1 in femoral impaction grafting in a sheep model. *J Orth Res* **22**: 1008-1015.
- Murakami, N., Saito, N., Takahashi, J., Ota, H., Horiuchi, H., Nawata, M., Okada, T., Nozaki, K. and Takaoka, K. (2003). Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials* **24**: 2153-2159.
- Nakayama, T., Cui, Y. and Christian J.L. (2000). Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *CMLS* **57**: 943-956.
- Newman, E., Turner, A.S. and Wark J.D. (1995). The Potential of Sheep for the Study of Osteopenia: Current Status and Comparison with Other Animal Models. *Bone* **16**: 277S-284S.
- Paramore, C.G., Lauryssen, C., Rauzzino, M.J., Wadlington, Van R., Palmer, C.A., Brix, A., Cartner, S.C. and Hadley, M.N. (1999). The Safety of OP-1 for Lumbar Fusion with Decompression-a Canine Study. *Neurosurgery* **44**: 1151-1155.
- Reddi, A.H. (1981). Cell biology and biochemistry of enchondral bone development. *Collagen Rel Res* **1**: 209-226.

- Reddi, A.H. (1994). Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin genet Dev* **4**: 737-744.
- Riley, E.H., Lane J.M., Urist M.R., Lyons K.M. and Liebermann J.R. (1996). Bone Morphogenetic Protein-2: Biology and Application. *Clin Orth* **324**: 39-46.
- Sampath, T.K. and Reddi, A.H. (1983). homology of bone-inductive proteins from human monkey, bovine and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci* **80**: 6591-6595.
- Sampath, T.K., Muthukumaran, N. and Reddi, A.H. (1987). Isolation of osteogenenin, an extracellular matrix-associated bone inductive protein by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 7109-7113.
- Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, K.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M., Pang, R.H.L., Corbet, C., Özkaynak, E., Oppermann, H. and Rueger, D.C. (1992). Recombinant Human Osteogenetic Protein-1 (hOP-1) Induces New Bone Formation in Vivo with a Specific Activity Comparable with Natural Bovine Osteogenetic Protein and Stimulates Osteoblast Proliferation and Differentiation in Vitro. *J Biol Chem* **267**: 20352-20362.
- Schildauer, T.A., Bostrom, M.P.G. and Lane, J.M. (1994). Embryonic distribution of bone morphogenetic proteins 2/4. A new neuronal role in development? *Orthop Trans* **18**: 426-427.
- Schlickewei, W. und Paul, C. (1991). Experimentelle Untersuchungen zum Knochenersatz mit bovinem Apatit. In: Huggler, A.H. und Kuner, E.H. (Hrsg) *Aktueller Stand beim Knochenersatz. Hefte zur Unfallheilkunde*, Springer, Berlin Heidelberg New York, S 59.
- Søballe, K., Hansen, E.S., Brockstedt-Rasmussen, H. and Bünger, C. (1993). Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J Bone Joint Surg Br* **75**: 270-278.
- Spivak, J.M., Ricci, J.L., Blumenthal, N.C. and Alexander, H. (1990). A new canine model to evaluate the biological response of intramedullary bone to implant materials and surfaces. *J Biomed Mater Res*. **24**:1121-1149.
- Stallforth, H. and Blömer, W. (1994). Biomechanical and technological aspects of cementless hip implants. In: Weller, S. and Volkmann, R. (Hrsg) *The bicontact hip implant system*. Thieme, Stuttgart New York, S 2.

- Sumner, D.R., Turner, T.M., Urban, R.M., Turek, T., Seeherman, H. and Wozney, J.M. (2004). *J Orth Res* **22**: 58-65.
- Sumner, D.R. and Galante, J.O. (1990). Bone ingrowth. In: Evarts CM, editor. *Surgery of the Musculoskeletal System*. New York: Churchill Livingstone, 151-176.
- Thies, R.S., Bauduy, M., Ashton, B.A., Kurtzberg, L., Wozney J.M. and Rosen V. (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* **130**: 1318-1324.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**:893-899.
- Urist, M.R., Silverman, M.F., Buring, K., Dubuc, F.L. and Rosenberg, J.M. (1967). The bone induction principle. *Clin Orthop relat Res* **53**: 243-283.
- Vehof, J.W.M., Mahmood, J., Takita, H., van t Hof, M.A., Kuboki, Y., Spauwen, P.H.M. and Jansen, J.A. (2001). Ectopic Bone Formation in Titanium Mesh Loaded with Bone Morphogenetic Protein and Coated with Calcium Phosphate. *Plast. Reconstr. Surg.* **108**: 434-443.
- Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R.M., Kriz, M.J., Luxenberg, D., Sibley, B. and Wozney, J. (1988). Purification and characterization of other distinct bone inducing factors. *Proc Natl acad Sci USA* **85**: 9484-9488.
- Wang, E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns K.M., LaPan P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moutsatsos, I.K., Nove, J. and Wozney, J.M. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2220-2224.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whittiers, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones activities. *Science* **242**: 1528-1534.
- Wozney, J.M. (1989). Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factors* **1**: 267-280.
- Wozney, J.M. (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* **32**: 160-167.
- Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S. (1991). Recombinant human bone

morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol **113**: 681-687.

11. Anhang

11.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Mollenhauer

OA Dr. med. A. Sachse

G. Grunert

C. Müller

K. Schmuck,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.12.2005

Matthias Keller

11.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Keller
Vorname: Matthias
Geburtsdatum/-ort: 24.09.1977, Pasewalk
Anschrift: Kronfeldstraße 17
07745 Jena
Familienstand: ledig

Schulbildung:

9/1984 – 7/1991 POS „Emil Wölk“ Jena

8/1991 – 6/1996 Ernst-Haeckel-Gymnasium, Jena
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note 1,2

Wehrdienst:

7/1996 – 4/1997 Grundwehrdienst in Veitshöchheim

Hochschulbildung:

10/1997 – 9/2002 Medizinstudium an der FSU Jena

10/2002 Beginn der Promotionsarbeit

4/2003 – 3/2004 Praktisches Jahr

17. 06. 2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note 2

Beruf:

01.01.2005 Beginn der Weiterbildung in der Unfallchirurgie im
Waldkrankenhaus Gera

Jena, 06.12.2005

11.3 Danksagung

Ganz herzlich danke ich Prof. Dr. J. Mollenhauer für die Vergabe des Themas und die großartige Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen.

Mein großer Dank geht auch an Dr. A. Sachse für seine Hilfe in allen klinischen Belangen und K. Schmuck für seine Unterstützung und seinen Rat in allen technischen Fragen.

Mein besonderer Dank geht auch an unser tolles Laborteam, welches entscheidend zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat: Cordula Müller und Gabriele Grunert für die Hilfe in der Histologie, Jana Schömburg und Christine Mollenhauer für die Hilfe in allen anfallenden Labortätigkeiten, Andrea Galonska im Sekretariat und unserem Fotografen Hardy Hauck.

Danken möchte ich auch allen, die außerhalb des Labors mit an dieser Arbeit beteiligt waren, Prof. Dr. R. Venbrocks, Dr. P. Hortschansky und dem Institut für Versuchstierkunde in Jena.